

Munia Lanao Maldonado

# Investigación de la inactivación de *Clostridium perfringens* y *Enterococcus* sp. en aguas mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación

Departamento  
Ingeniería Química y Tecnologías del Medio  
Ambiente

Director/es  
Ormad Melero, María Peña

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

INVESTIGACIÓN DE LA INACTIVACIÓN DE  
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS Y ENTEROCOCCUS  
SP. EN AGUAS MEDIANTE PROCESOS  
CONVENCIONALES Y AVANZADOS DE  
OXIDACIÓN

Autor

Munia Lanao Maldonado

Director/es

Ormad Melero, María Peña

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente

2012





**Departamento de Ingeniería  
Química y Tecnologías  
del Medio Ambiente  
Universidad Zaragoza**

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

**Investigación de la inactivación de *Clostridium perfringens* y  
*Enterococcus* sp. en aguas mediante procesos convencionales  
y avanzados de oxidación**

**Memoria**

que para optar al Grado de Doctora  
por la Universidad de Zaragoza

presenta

**Dña. Munia Lanao Maldonado**

Zaragoza, Mayo de 2012





**Dña. M<sup>a</sup> PEÑA ORMAD MELERO**, Profesora Titular del Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente en el Área de Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza

INFORMA,

Que el trabajo contenido en la presente Memoria de Tesis Doctoral titulada:

**“Investigación de la inactivación de *Clostridium perfringens* y *Enterococcus* sp. en aguas mediante procesos convencionales y avanzados de oxidación”** realizada por **Dña. MUNIA LANA O MALDONADO**, ha sido realizado bajo mi dirección y se corresponde y adecúa al proyecto de tesis aprobado por el Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza.

Y para que así conste, firmo este certificado en Zaragoza, a 10 de mayo de 2012.

Fdo.: Dra. M<sup>a</sup> Peña Ormad Melero



# Índice General

Índice de figuras .....	vi
Índice de tablas .....	xiv
Capítulo 1. Introducción y objetivos.....	1
Capítulo 2. Control de calidad de las aguas de abastecimiento .....	3
2.1. Contaminación microbiológica de las aguas .....	11
2.1.1. Gérmenes patógenos de transmisión hídrica.....	11
2.1.2. Indicadores microbiológicos de contaminación fecal .....	15
2.1.3. Normas de calidad microbiológica en aguas.....	20
2.2. Plantas de tratamiento de aguas para abastecimiento .....	25
2.2.1. Estación de tratamiento de aguas potables .....	25
2.2.2. Estación de tratamiento de regeneración de aguas residuales depuradas .....	30
2.3. Técnicas de desinfección y oxidación convencionales .....	33
2.3.1. Generalidades.....	33
2.3.2. Cloro y derivados.....	34
2.3.3. Dióxido de cloro .....	36
2.3.4. Ozono.....	37
2.3.5. Radiación solar .....	39
2.4. Procesos de oxidación avanzada.....	42
2.4.1. Generalidades.....	42
2.4.2. Ozonización a alto pH.....	43
2.4.3. Sistema peroxona ( $O_3/H_2O_2$ ).....	45
2.4.4. Ozonización catalítica.....	46
2.4.5. Fotocatálisis.....	47
2.4.6. Fotocatálisis con $H_2O_2$ .....	52
2.4.6. Radiación solar con $H_2O_2$ .....	53

Capítulo 3. Procedimientos analíticos y de tratamiento de datos .....	55
3.1. Parámetros de caracterización de TiO <sub>2</sub> .....	57
3.1.1. Superficie específica.....	57
3.1.2. Caracterización estructural.....	58
3.2. Parámetros de caracterización físico-química de aguas .....	58
3.2.1. Demanda de cloro .....	58
3.2.2. Temperatura, pH, conductividad, turbidez, carbono orgánico total, absorbancia, Cl <sub>2</sub> libre, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y O <sub>3</sub> residual.....	59
3.3. Parámetros de análisis microbiológicos .....	61
3.3.1. Análisis de <i>C. perfringens</i> .....	61
3.3.1.1. Procedimiento normalizado .....	61
3.3.1.2. Medios de cultivo .....	61
3.3.1.3. Equipos de laboratorio .....	63
3.3.1.4. Diluciones decimales seriadas.....	64
3.3.1.5. Método de filtración de membrana .....	65
3.3.1.6. Incubación .....	66
3.3.1.7. Recuento e inactivación.....	66
3.3.1.8. Caracterización bacteriana por la tinción de Gram.....	67
3.3.1.9. Repetibilidad del método de análisis de <i>C. perfringens</i> .....	69
3.3.2. Análisis de <i>Enterococcus</i> sp. ....	71
3.3.2.1. Procedimiento normalizado .....	71
3.3.2.2. Medios de cultivo .....	71
3.3.2.3. Equipos de laboratorio .....	71
3.3.2.4. Diluciones decimales seriadas.....	72
3.3.2.5. Método de filtración de membrana .....	72
3.3.2.6. Incubación .....	72
3.3.2.7. Recuento e inactivación.....	72
3.3.2.8. Caracterización bacteriana por la tinción de Gram.....	72
3.3.2.9. Repetibilidad del método de análisis de <i>Enterococcus</i> sp. ....	73
3.4. Tratamiento de datos .....	73
3.4.1. Estudio de las variables influyentes en los tratamientos de desinfección .....	73

3.4.2. Tratamiento estadístico de comparación de resultados .....	74
3.4.3. Modelos cinéticos de inactivación microbiana .....	75
3.4.3.1. Descripción de modelos .....	75
3.4.3.2. Ajuste de datos experimentales e índices de error .....	82
Capítulo 4. Eliminación de <i>C. perfringens</i> y <i>Enterococcus</i> sp. mediante tratamientos convencionales .....	85
4.1. Estudios de eliminación bacteriana en una ETAP real .....	87
4.1.1. Descripción de la instalación y de las etapas .....	87
4.1.2. Muestras .....	88
4.1.3. Resultados de inactivación de <i>C. perfringens</i> y <i>Enterococcus</i> sp. ....	88
4.2. Estudios de eliminación bacteriana a escala de laboratorio .....	92
4.2.1. Muestras .....	92
4.2.1.1. Muestras de agua natural.....	92
4.2.1.2. Muestras de agua natural fortificadas.....	93
4.2.2. Preoxidación con hipoclorito sódico .....	98
4.2.2.1. Procedimiento experimental.....	98
4.2.2.2. Resultados de inactivación de células vegetativas de <i>C. perfringens</i> .....	99
4.2.2.3. Resultados de inactivación de esporos de <i>C. perfringens</i> .....	100
4.2.2.4. Resultados de inactivación de <i>Enterococcus</i> sp.....	101
4.2.2.5. Modelización cinética .....	103
4.2.2.6. Estudio económico .....	111
4.2.3. Coagulación, floculación y decantación .....	112
4.2.3.1. Procedimiento experimental.....	112
4.2.3.2. Resultados .....	112
4.2.4. Filtración.....	114
4.2.4.1. Procedimiento experimental.....	114
4.2.4.2. Resultados .....	114
4.2.5. Adsorción con carbón activo .....	115
4.2.5.1. Procedimiento experimental.....	115
4.2.5.2. Resultados .....	116

Capítulo 5. Eliminación de <i>C. perfringens</i> y <i>Enterococcus</i> sp. mediante POAs basados en irradiación UV/VIS. ....	119
5.1. Procedimiento experimental.....	121
5.1.1. Muestras .....	121
5.1.1.1. Muestras de agua natural fortificadas con <i>Enterococcus</i> sp. ....	121
5.1.1.2. Muestras de agua natural fortificadas con células vegetativas de <i>C. perfringens</i> .....	121
5.1.1.3. Muestras de agua natural fortificadas con esporos de <i>C. perfringens</i> .....	121
5.1.2. Agentes utilizados en los tratamientos .....	121
5.1.2.1. Radiación solar simulada .....	121
5.1.2.2. Dióxido de titanio.....	123
5.1.2.3. Peróxido de hidrógeno .....	124
5.2. Condiciones de operación, resultados e interpretación .....	124
5.2.1. Inactivación de células vegetativas y esporos de <i>C. perfringens</i> .....	124
5.2.1.1. Condiciones de operación.....	124
5.2.1.2. Resultados del tratamiento de irradiación .....	125
5.2.1.3. Resultados del tratamiento de fotocátalisis .....	127
5.2.1.4. Resultados del tratamiento de irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	130
5.2.1.5. Resultados del tratamiento de fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	133
5.2.1.6. Estudio de influencia de variables.....	136
5.2.2. Inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. ....	139
5.2.2.1. Condiciones de operación.....	139
5.2.2.2. Resultados de los tratamientos con radiación UVB, UVA y visible (290-800nm) .....	141
5.2.2.3. Resultados de los tratamientos con radiación UVA y visible (320-800nm) .....	146
5.2.2.4. Estudio de influencia de variables.....	153
5.2.3. Modelización cinética .....	158
5.3. Estudio económico .....	183
Capítulo 6. Eliminación de <i>C. perfringens</i> y <i>Enterococcus</i> sp. mediante POAs basados en ozono .....	187
6.1. Procedimiento experimental.....	189

6.1.1. Muestras .....	189
6.1.1.1. Muestras de agua sintética fortificadas con células vegetativas de <i>C. perfringens</i> .....	189
6.1.1.2. Muestras de agua natural fortificadas con células vegetativas de <i>C. perfringens</i> .....	189
6.1.1.3. Muestras de agua natural fortificadas con <i>Enterococcus</i> sp. ....	189
6.1.2. Agentes utilizados en los tratamientos .....	189
6.1.2.1. Ozono .....	189
6.1.2.2. Dióxido de titanio .....	193
6.1.2.3. Peróxido de hidrógeno .....	193
6.2. Condiciones de operación, resultados e interpretación .....	193
6.2.1. Condiciones de operación .....	193
6.2.2. Inactivación de células vegetativas de <i>C. perfringens</i> .....	194
6.2.2.1. Resultados del tratamiento de ozonización .....	194
6.2.2.2. Resultados del tratamiento de peroxona ( $O_3/H_2O_2$ ) .....	197
6.2.2.3. Resultados del tratamiento de ozono combinado con $TiO_2$ .....	200
6.2.2.4. Estudio de influencia de variables .....	203
6.2.3. Inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. ....	207
6.2.3.1. Resultados del tratamiento de ozonización .....	207
6.2.3.2. Resultados del tratamiento peroxona .....	209
6.2.3.3. Resultados del tratamiento de ozono combinado con $TiO_2$ .....	211
6.2.3.4. Resultados del tratamiento de $O_3/H_2O_2/TiO_2$ .....	212
6.2.3.5. Estudio de influencia de variables .....	214
6.2.4. Modelización cinética .....	216
6.3. Estudio económico .....	230
Capítulo 7. Conclusiones .....	233
7.1. Conclusiones generales .....	235
7.2. Conclusiones particulares .....	236
Capítulo 8. Bibliografía .....	241
ANEXO. Publicaciones científicas .....	259



## Índice de figuras

Figura 2.1. Composición estructural de la pared celular de una bacteria Grampositiva y una Gramnegativa ( <i>Gamazo et al., 2005</i> ).....	12
Figura 2.2. (a) Línea de tratamiento simple para un agua bruta de calidad A1. (b) Línea de tratamiento normal para un agua bruta de calidad A2. (c <sub>1</sub> y c <sub>2</sub> ) Líneas de tratamiento intensivo para un agua bruta de calidad A3. ....	26
Figura 2.3. Diferentes esquemas de tratamiento de regeneración en ERARs. ....	32
Figura 2.4. Espectro de la radiación UV/VIS. ....	40
Figura 2.5. Interacciones entre partículas y bacterias, que pueden influir en la desinfección con radiación UV ( <i>Ibarz, 2008</i> ).....	42
Figura 2.6. Mecanismo de activación fotoinducida del dióxido de titanio con la presencia de microorganismos (M) ( <i>Oppenländer, 2003</i> ). ....	48
Figura 2.7. Mecanismo de ataque microbiano mediante el tratamiento de fotocátalisis ( <i>Fernández et al., 2005</i> ). ....	50
Figura 3.1. Aspecto de colonias de <i>C. perfringens</i> en el agar SPS. ....	63
Figura 3.2. Esquema del método de diluciones seriadas. ....	64
Figura 3.3. Aspecto de las placas de Petri después de la siembra de las diluciones decimales de una muestra de agua (de la más concentrada 0 a la más diluida -5).....	65
Figura 3.4. Método de filtración por membrana ( <i>Millipore</i> ). ....	66
Figura 3.5. Técnica de coloración de Gram.....	68
Figura 3.6. Aspecto de colonias de <i>Enterococcus</i> sp. en el agar SB.....	71
Figura 3.7. Curvas de supervivencia microbiana posibles (Fuente: <i>Gyürék and Finch, 1998</i> ). .	77
Figura 4.1. Eliminación de <i>C. perfringens</i> y <i>Enterococcus</i> sp. ( <i>Ibarz, 2008</i> ) a lo largo de las diferentes etapas del proceso de potabilización a escala real.....	90
Figura 4.2. Colonias de <i>C. perfringens</i> en Agar Schaedler-sangre y técnica de siembra en superficie con hisopo.....	95
Figura 4.3. Técnica de aislamiento en superficie por agotamiento. ....	98
Figura 4.4. Colonias de <i>Enterococcus</i> sp. en agar nutritivo. ....	98
Figura 4.5. Inactivación de las células vegetativas de <i>C. perfringens</i> en el tratamiento de preoxidación con hipoclorito sódico. N <sub>0</sub> = 2,5 ·10 <sup>8</sup> UFC·100 mL <sup>-1</sup> . ....	99

Figura 4.6. Inactivación de la población esporulada de <i>C. perfringens</i> durante el tratamiento de preoxidación con hipoclorito sódico. $N_0 = 3,7 \cdot 10^3$ UFC $\cdot 100$ mL <sup>-1</sup> . ....	101
Figura 4.7. Inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento de preoxidación con hipoclorito sódico. $N_0 = 2,8 \cdot 10^8$ UFC $\cdot 100$ mL <sup>-1</sup> . ....	102
Figura 4.8. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de las células vegetativas de <i>C. perfringens</i> mediante el tratamiento de cloración. ....	105
Figura 4.9. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de los esporos de <i>C. perfringens</i> mediante el tratamiento de cloración. ....	106
Figura 4.10. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. mediante el tratamiento de cloración. ....	106
Figura 4.11. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica observada experimentalmente y la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados sobre las células vegetativas de <i>C. perfringens</i> mediante tratamiento de cloración. ....	108
Figura 4.12. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica observada experimentalmente y la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados sobre los esporos de <i>C. perfringens</i> mediante tratamiento de cloración. ....	109
Figura 4.13. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica observada experimentalmente y la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados sobre <i>Enterococcus</i> sp. mediante tratamiento de cloración....	110
Figura 4.14. Jar Test. ....	113
Figura 4.15. Cono Imhoff. ....	113
Figura 5.1. Cámara solar utilizada. ....	122
Figura 5.2. Radiometría de la luz solar y lámpara de xenon con y sin filtro de ventana. Espectro solar simulado y natural; (a) sin filtro de ventana, (b) con filtro de "vidrio de ventana" (Miguel, 2010). ....	122
Figura 5.3. Difractograma del TiO <sub>2</sub> . ....	124
Figura 5.4. Inactivación de las células vegetativas de <i>C. perfringens</i> en oscuridad (○) y en el tratamiento de irradiación (●) sobre la muestra natural. $\lambda = 320-800$ nm. $N_0 = 7,7 \cdot 10^8$ UFC $\cdot 100$ mL <sup>-1</sup> ....	126
Figura 5.5. Inactivación de esporos de <i>C. perfringens</i> en el tratamiento de irradiación sobre la muestra natural. $\lambda = 320-800$ nm. $N_0 = 5,9 \cdot 10^3$ UFC $\cdot 100$ mL <sup>-1</sup> . ....	127

Figura 5.6. Inactivación de las células vegetativas de <i>C. perfringens</i> en el tratamiento de TiO <sub>2</sub> (○) y fotocátalisis (●) sobre la muestra natural. $\lambda=320-800$ nm. $N_0=5\cdot10^8$ UFC· 100 mL <sup>-1</sup> . [TiO <sub>2</sub> ]=1 g L <sup>-1</sup> . .....	129
Figura 5.7. Inactivación de esporos de <i>C. perfringens</i> en el tratamiento de TiO <sub>2</sub> (□) y fotocátalisis (■) sobre la muestra natural. $\lambda=320-800$ nm. $N_0=3,3\cdot10^3$ UFC· 100 mL <sup>-1</sup> . [TiO <sub>2</sub> ]=1 g L <sup>-1</sup> . .....	129
Figura 5.8. Inactivación de células vegetativas de <i>C. perfringens</i> en el tratamiento de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (○) e irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (●) sobre la muestra natural. $\lambda=320-800$ nm. $N_0=7,2\cdot10^8$ UFC· 100 mL <sup>-1</sup> . [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=0,04 mM. ....	132
Figura 5.9. Inactivación de esporos de <i>C. perfringens</i> en el tratamiento de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (□) e irradiación/ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (■) sobre la muestra natural. $\lambda=320-800$ nm. $N_0=2,3\cdot10^3$ UFC· 100 mL <sup>-1</sup> . [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=0,04 mM. ....	132
Figura 5.10. Inactivación de células vegetativas de <i>C. perfringens</i> en el tratamiento de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /TiO <sub>2</sub> (○) y fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (●) sobre la muestra natural. . $\lambda=320-800$ nm. $N_0=7,2\cdot10^8$ UFC· 100 mL <sup>-1</sup> . [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=0,04 mM. [TiO <sub>2</sub> ]=1 g L <sup>-1</sup> . ....	134
Figura 5.11. Inactivación de esporos de <i>C. perfringens</i> en el tratamiento de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /TiO <sub>2</sub> (□) y fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (■) sobre la muestra natural. $\lambda=320-800$ nm. $N_0=2\cdot10^3$ UFC· 100 mL <sup>-1</sup> . [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=0,04 mM. [TiO <sub>2</sub> ]=1 g L <sup>-1</sup> . ....	136
Figura 5.12. Influencia de las variables seleccionadas en los procesos de radiación solar sobre las células vegetativas de <i>C. perfringens</i> . ....	137
Figura 5.13. Influencia de las variables seleccionadas en los procesos de radiación solar sobre los esporos de <i>C. perfringens</i> . ....	138
Figura 5.14. Representación gráfica de las interacciones entre variables sobre las células vegetativas de <i>C. perfringens</i> . ....	139
Figura 5.15. Representación gráfica de las interacciones entre variables sobre los esporos de <i>C. perfringens</i> . ....	139
Figura 5.16. Inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. en los tratamientos de irradiación (◇), fotocátalisis (△), irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (□) y fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (○) sobre la muestra natural. $N_0\approx10^8$ UFC· 100 mL <sup>-1</sup> . Rango de $\lambda$ : 290-800 nm. [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=0,04 mM. [TiO <sub>2</sub> ]=1 g L <sup>-1</sup> . $\lambda=290-800$ nm. ....	143
Figura 5.17. Inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. tras los tratamientos de irradiación (◆), fotocátalisis (▲), irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (■) y fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (●). La línea discontinua marca el comienzo del periodo de de oscuridad. $\lambda$ : 290-800 nm. $N_0\approx10^8$ UFC· 100 mL <sup>-1</sup> . [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=0,04 mM. [TiO <sub>2</sub> ]=1 g L <sup>-1</sup> . ....	144

Figura 5.18. Inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. en los tratamientos de irradiación (◇), fotocátalisis (△), irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (□) y fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (○). Iluminación intermitente. λ: 320-800 nm. N <sub>0</sub> ≈ 10 <sup>8</sup> UFC·100 mL <sup>-1</sup> . [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=0,04 mM. [TiO <sub>2</sub> ]=1 g L <sup>-1</sup> . .....	147
Figura 5.19. Inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. en los tratamientos de irradiación (◇), fotocátalisis (△), irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (□) y fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (○). Iluminación continua. λ: 320-800 nm. N <sub>0</sub> ≈ 10 <sup>8</sup> UFC·100 mL <sup>-1</sup> . [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=0,04 mM. [TiO <sub>2</sub> ]=1 g L <sup>-1</sup> . .....	150
Figura 5.20. Inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. tras los tratamientos de irradiación (◆), fotocátalisis (▲), irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (■) y fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (●). La línea discontinua marca el comienzo del periodo de de oscuridad de 180 minutos. Iluminación intermitente. λ= 320-800 nm. N <sub>0</sub> ≈ 10 <sup>8</sup> CFU·100 mL <sup>-1</sup> . [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=0,04 mM. [TiO <sub>2</sub> ]=1 g L <sup>-1</sup> . .....	151
Figura 5.21. Duración de la desinfección obtenida tras los tratamientos aplicados con irradiación continua, después de 24h de permanencia en oscuridad. ....	152
Figura 5.22. Inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. tras los tratamientos de irradiación (◆), fotocátalisis (▲), irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (■) y fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (●). La línea discontinua marca el comienzo del periodo de de oscuridad de 180 minutos. Iluminación continua. λ: 320-800 nm. N <sub>0</sub> ≈ 10 <sup>8</sup> CFU· 100 mL <sup>-1</sup> . [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=0,04 mM. [TiO <sub>2</sub> ]=1 g L <sup>-1</sup> . .....	153
Figura 5.23. Influencia de las variables seleccionadas en los procesos de radiación solar sobre <i>Enterococcus</i> sp. ....	154
Figura 5.24. Representación gráfica de las interacciones entre variables sobre <i>Enterococcus</i> sp. ....	155
Figura 5.25. Diagrama de Pareto en el que se muestran los efectos significativos sobre el factor respuesta <i>Enterococcus</i> sp. ....	155
Figura 5.26. Influencia de las variables seleccionadas (sin radiación UVB) en los procesos de radiación solar sobre <i>Enterococcus</i> sp. ....	156
Figura 5.27. Representación gráfica de las interacciones entre variables (sin radiación UVB) sobre <i>Enterococcus</i> sp. ....	157
Figura 5.28. Diagrama de Pareto en el que se muestran los efectos significativos (sin radiación UVB) sobre el factor respuesta <i>Enterococcus</i> sp. ....	157
Figura 5.29. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de c de <i>C. perfringens</i> mediante los tratamientos de irradiación (A), irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (B), fotocátalisis (C) y fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (D). λ 320-800 nm. ....	164

Figura 5.30. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de esporos de <i>C. perfringens</i> mediante los tratamientos de irradiación (A), irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (B), fotocátalisis (C) y fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (D). $\lambda$ 320-800 nm.....	165
Figura 5.31. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. mediante los tratamientos de irradiación (A), irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (B), fotocátalisis (C) y fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (D). $\lambda$ 320-800 nm.....	166
Figura 5.32. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. mediante los tratamientos de irradiación (A), irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (B), fotocátalisis (C) y fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (D). $\lambda$ 290-800 nm.....	167
Figura 5.33. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica observada experimentalmente y la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados sobre las células vegetativas de <i>C. perfringens</i> mediante tratamiento de irradiación. $\lambda$ 320-800 nm.....	168
Figura 5.34. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica observada experimentalmente y la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados sobre los esporos (arriba) y <i>Enterococcus</i> sp. (abajo) mediante tratamiento de irradiación. $\lambda$ 320-800 nm.....	169
Figura 5.35. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica observada experimentalmente y la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados sobre las células vegetativas de <i>C. perfringens</i> mediante tratamiento de irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . $\lambda$ 320-800 nm.....	170
Figura 5.36. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica observada experimentalmente y la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados sobre los esporos de <i>C. perfringens</i> mediante tratamiento de irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . $\lambda$ 320-800 nm. ....	171
Figura 5.37. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica observada experimentalmente y la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados sobre <i>Enterococcus</i> sp. mediante tratamiento de irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . $\lambda$ 320-800 nm. ....	172
Figura 5.38. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de las células vegetativas de <i>C. perfringens</i> en el tratamiento de fotocátalisis. $\lambda$ 320-800 nm.....	173
Figura 5.39. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de las células vegetativas de esporos en el tratamiento de fotocátalisis. $\lambda$ 320-800 nm.....	174

Figura 5.40. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento de fotocátalisis. $\lambda$ 320-800 nm. ....	175
Figura 5.41. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica obseveda experimentalmente y la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados sobre las células vegetativas de <i>C. perfringens</i> en el tratamiento de fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . $\lambda$ : 320-800 nm. ....	176
Figura 5.42. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de esporos en el tratamiento de fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . $\lambda$ 320-800 nm. ....	177
Figura 5.43. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento de fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . $\lambda$ 320-800 nm. ....	178
Figura 5.44. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento de irradiación. $\lambda$ 290-800 nm. ....	179
Figura 5.45. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento de irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . $\lambda$ 290-800 nm. ....	180
Figura 5.46. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento de fotocátalisis. $\lambda$ 290-800 nm. ....	181
Figura 5.47. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento de fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . $\lambda$ 290-800 nm. ....	182
Figura 6.1. Esquema de generación de ozono mediante descarga eléctrica.....	190
Figura 6.2. Descripción de la instalación de ozonización. ....	191
Figura 6.3. Inactivación de las células vegetativas de <i>C. perfringens</i> en el tratamiento de ozonización sobre la muestra natural y sintética. $N_0=2,7 \cdot 10^6$ y $N_0=3,9 \cdot 10^7$ UFC·100mL <sup>-1</sup> , respectivamente. ....	195

Figura 6.4. Inactivación de las células vegetativas de <i>C. perfringens</i> en el tratamiento de peroxona sobre la muestra natural y sintética. $N_0 = 9,8 \cdot 10^5$ y $N_0 = 9 \cdot 10^7$ UFC·100mL <sup>-1</sup> , respectivamente. $[H_2O_2] = 0,04$ mM.....	199
Figura 6.5. Inactivación de las células vegetativas de <i>C. perfringens</i> en el tratamiento de ozono combinado con TiO <sub>2</sub> sobre la muestra natural y sintética. $N_0 = 10^6$ y $N_0 = 5,7 \cdot 10^7$ UFC·100mL <sup>-1</sup> , respectivamente. $[TiO_2] = 1$ g L <sup>-1</sup> . ....	201
Figura 6.6. Influencia de las variables seleccionadas en los procesos de ozono sobre <i>C. perfringens</i> .....	204
Figura 6.7. Representación gráfica de las interacciones entre las variables utilizadas en los tratamientos de ozonización sobre <i>C. perfringens</i> .....	204
Figura 6.8. Diagrama de Pareto en el que se muestran los efectos significativos sobre el factor respuesta de inactivación.....	205
Figura 6.9. Influencia de las variables seleccionadas en los procesos de ozono sobre <i>C. perfringens</i> (estudio complementario). ....	206
Figura 6.10. Representación gráfica de las interacciones entre las variables utilizadas en los tratamientos de ozonización sobre <i>C. perfringens</i> (estudio complementario). ....	206
Figura 6.11. Diagrama de Pareto en el que se muestran los efectos significativos sobre el factor respuesta de inactivación.....	207
Figura 6.12. Inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento de ozonización sobre la muestra natural. $N_0 = 3,2 \cdot 10^8$ UFC·100mL <sup>-1</sup> .....	208
Figura 6.13. Inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento de peroxona sobre la muestra natural. $N_0 = 4,7 \cdot 10^8$ UFC·100mL <sup>-1</sup> . $[H_2O_2] = 0,04$ mM. ....	210
Figura 6.14. Inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento de ozono combinado con TiO <sub>2</sub> sobre la muestra natural. $N_0 = 6,2 \cdot 10^7$ UFC·100mL <sup>-1</sup> . $[TiO_2] = 1$ g L <sup>-1</sup> .....	212
Figura 6.15. Inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /TiO <sub>2</sub> sobre la muestra natural. $N_0 = 7,5 \cdot 10^7$ UFC·100mL <sup>-1</sup> . $[H_2O_2] = 0,04$ mM. $[TiO_2] = 1$ g L <sup>-1</sup> . ....	213
Figura 6.16. Influencia de las variables seleccionadas en los procesos de ozono sobre <i>Enterococcus</i> sp.....	215
Figura 6.17. Representación gráfica de las interacciones entre las variables utilizadas en los tratamientos de ozonización sobre <i>Enterococcus</i> sp.....	215
Figura 6.18. Diagrama de Pareto en el que se muestran los efectos significativos sobre el factor respuesta de inactivación.....	216
Figura 6.19. Ajuste de los cuatro modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de las células vegetativas de <i>C. perfringens</i> en los tratamientos de ozonización (A), peroxona (B) y O <sub>3</sub> /TiO <sub>2</sub> (C). ....	221

Figura 6.21.	Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de <i>C. perfringens</i> en el tratamiento de ozonización.....	223
Figura 6.22.	Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de <i>C. perfringens</i> en el tratamiento de peroxona.....	224
Figura 6.23.	Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de <i>C. perfringens</i> en el tratamiento de O <sub>3</sub> /TiO <sub>2</sub> .....	225
Figura 6.24.	Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento de ozonización. ....	226
Figura 6.25.	Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento de peroxona. ....	227
Figura 6.26.	Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento de O <sub>3</sub> /TiO <sub>2</sub> . ....	228
Figura 6.27.	Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento de O <sub>3</sub> /TiO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	229



## Índice de tablas

Tabla 2.1. Enfermedades bacterianas de transmisión hídrica (EPA, 1999).....	14
Tabla 2.2. Enfermedades parasitarias de transmisión hídrica (EPA, 1999). ....	14
Tabla 2.3. Enfermedades víricas de transmisión hídrica (EPA, 1999). ....	14
Tabla 2.4. Normas de la ISO y AENOR para la detección y recuento de bacterias indicadoras fecales en agua.....	17
Tabla 2.5. Referencias sobre <i>C. perfringens</i> como indicador adecuado de patógenos resistentes. ....	20
Tabla 2.6. Normas de calidad microbiológica en aguas continentales, en función de su uso.	23
Tabla 2.7. Normas de calidad microbiológica en aguas reutilizadas, en función de su uso....	24
Tabla 2.8. Microorganismos presentes en aguas del Canal Imperial de Aragón antes de su entrada a la ETAP de Zaragoza. ....	25
Tabla 2.9. Tratamiento recomendado para cada categoría de agua prepotable. ....	26
Tabla 2.10. Microorganismos presentes en aguas residuales urbanas, antes y después del tratamiento de depuración. ....	30
Tabla 2.11. Posibles tratamientos de regeneración en función del uso destinado. ....	31
Tabla 3.1. Instrumentación, metodología, rango de medida y error de cada uno de los instrumentos para la caracterización físico-química de las muestras. ....	60
Tabla 3.2. Composición del agar SPS.....	63
Tabla 3.3. Equipos de laboratorio utilizados en los análisis microbiológicos.....	63
Tabla 3.4. Coeficiente de variación del método de filtración de membrana sobre <i>C. perfringens</i> para varios volúmenes de muestra. ....	70
Tabla 3.5. Composición del agar SB.....	71
Tabla 3.6. Modelos cinéticos de estudio aplicados. ....	78
Tabla 4.1. Etapas de la ETAP de Navarra. ....	87
Tabla 4.2. Rangos de residencia del agua en cada una de las etapas de la ETAP. ....	88
Tabla 4.3. Caracterización físico-química de las muestras en cada punto de muestreo de la ETAP.....	89

Tabla 4.4. Eliminación de células vegetativas de <i>C. perfringens</i> y <i>Enterococcus</i> sp. en cada punto de muestreo de la ETAP.....	89
Tabla 4.5. Caracterización de la muestra de agua natural.....	93
Tabla 4.6. Pruebas bioquímicas de confirmación de <i>C. perfringens</i> . ....	94
Tabla 4.7. Composición del caldo tioglicolato con resazurina.....	95
Tabla 4.8. Composición del agar Schaedler. ....	95
Tabla 4.9. Composición del caldo de esporulación Duncan-Strong.....	96
Tabla 4.10. Composición del agar nutritivo.....	97
Tabla 4.11. Recuentos de células vegetativas de <i>C. perfringens</i> durante el tratamiento de cloración (UFC·100mL <sup>-1</sup> ) y concentración de cloro residual (mg L <sup>-1</sup> ). ....	99
Tabla 4.12. Recuentos de esporos de <i>C. perfringens</i> durante el tratamiento de cloración (UFC·100mL <sup>-1</sup> ) y concentración de cloro residual (mg L <sup>-1</sup> ).....	100
Tabla 4.13. Recuentos de <i>Enterococcus</i> sp. durante el tratamiento de cloración (UFC·100mL <sup>-1</sup> ) y concentración de cloro residual (mg L <sup>-1</sup> ). ....	102
Tabla 4.14. Parámetros cinéticos del modelo de Hom modificado aplicados sobre la inactivación de las tres formas bacterianas de estudio en el tratamiento de cloración. ....	104
Tabla 4.15. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicados sobre la inactivación de las tres formas bacterianas de estudio en el tratamiento de cloración.....	104
Tabla 4.16. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicados sobre la inactivación de las tres formas bacterianas de estudio en el tratamiento de cloración.....	104
Tabla 4.17. Costes del tratamiento de cloración para la inactivación de un 1 unidad logarítmica sobre <i>C. perfringens</i> (células y esporos) y <i>Enterococcus</i> sp.....	111
Tabla 4.18. Resultados físico-químicos y microbiológicos en las etapas de coagulación, floculación y decantación.....	113
Tabla 4.19. Resultados físico-químicos y microbiológicos en la etapa de filtración. ....	114
Tabla 4.20. Características del carbón activo en polvo ChiemiVall V Plus. ....	116
Tabla 4.21. Resultados físico-químicos y microbiológicos en la etapa de adsorción. ....	116
Tabla 5.1. Recuentos de células vegetativas y esporos de <i>C. perfringens</i> (UFC·100mL <sup>-1</sup> ) durante los tratamientos de oscuridad e irradiación ( $\lambda$ : 320-800 nm) sobre la muestra natural.....	126

Tabla 5.2. Recuentos de células vegetativas y esporos de <i>C. perfringens</i> (UFC·100mL <sup>-1</sup> ) durante los tratamientos de TiO <sub>2</sub> y fotocátalisis ( $\lambda$ : 320-800 nm) sobre la muestra natural. ....	128
Tabla 5.3. Recuentos de células vegetativas y esporos de <i>C. perfringens</i> (UFC·100mL <sup>-1</sup> ) durante los tratamientos de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ( $\lambda$ : 320-800 nm) sobre la muestra natural.....	130
Tabla 5.4. Recuentos de células vegetativas y esporos de <i>C. perfringens</i> (UFC·100mL <sup>-1</sup> ) durante los tratamientos de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /TiO <sub>2</sub> y fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ( $\lambda$ : 320-800 nm) sobre la muestra natural. ....	134
Tabla 5.5. Niveles de las variables en los tratamientos de radiación solar sobre <i>C. perfringens</i> (células vegetativas y esporos).....	136
Tabla 5.6. Recuentos de <i>Enterococcus</i> sp. (UFC·100mL <sup>-1</sup> ) durante los tratamientos de irradiación, fotocátalisis, irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ( $\lambda$ : 290-800 nm) sobre la muestra natural. ....	141
Tabla 5.7. Recuentos de <i>Enterococcus</i> sp. (UFC·100mL <sup>-1</sup> ) antes y después de los tratamientos de oscuridad, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , TiO <sub>2</sub> y TiO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre la muestra natural. ....	142
Tabla 5.8. Recuentos de <i>Enterococcus</i> sp. (UFC·100mL <sup>-1</sup> ) durante los tratamientos de irradiación, fotocátalisis, irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre la muestra natural. $\lambda$ : 320-800 nm. ....	146
Tabla 5.9. Recuentos de <i>Enterococcus</i> sp. (UFC·100mL <sup>-1</sup> ) durante los tratamientos de irradiación, fotocátalisis, irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre la muestra natural. $\lambda$ : 320-800 nm. ....	149
Tabla 5.10. Niveles de las variables en los tratamientos de radiación solar sobre <i>Enterococcus</i> sp. ....	153
Tabla 5.11. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de las tres formas bacterianas de estudio en el tratamiento de irradiación ( $\lambda$ : 320-800 nm). ....	159
Tabla 5.12. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de las tres formas bacterianas de estudio en el tratamiento de fotocátalisis ( $\lambda$ : 320-800 nm). ....	159
Tabla 5.13. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de las tres formas bacterianas de estudio en el tratamiento de irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ( $\lambda$ : 320-800 nm).....	160
Tabla 5.14. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de las tres formas bacterianas de estudio en el tratamiento de fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ( $\lambda$ : 320-800 nm). ....	160

Tabla 5.15. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. en los tratamientos de irradiación, fotocátalisis, irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ( $\lambda$ : 290-800 nm).....	162
Tabla 5.16. Coste de los agentes utilizados en los tratamientos de irradiación.....	183
Tabla 5.17. Costes del tratamiento de irradiación, fotocátalisis, irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> para la inactivación de un 1 unidad logarítmica sobre <i>C. perfringens</i> (células y esporos) y <i>Enterococcus</i> sp.....	184
Tabla 6.1. Resultados físico-químicos en el tratamiento de ozonización sobre la muestra natural (MN) y sintética (MS) de <i>C. perfringens</i> (células vegetativas). ....	194
Tabla 6.2 Recuentos de células vegetativas de <i>C. perfringens</i> y condiciones del tratamiento de ozonización sobre la muestra natural (MN) y sintética (MS). ....	195
Tabla 6.3. Resultados físico-químicos en el tratamiento de peroxona sobre la muestra natural (MN) y sintética (MS) de <i>C. perfringens</i> (células vegetativas). ....	197
Tabla 6.4. Recuentos de células vegetativas de <i>C. perfringens</i> y condiciones del tratamiento de peroxona sobre la muestra natural (MN) y sintética (MS). [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=0,04 mM. ....	198
Tabla 6.5. Resultados físico-químicos en el tratamiento de ozono combinado con TiO <sub>2</sub> sobre la muestra natural (MN) y sintética (MS) de <i>C. perfringens</i> (células vegetativas).200	
Tabla 6.6. Recuentos de células vegetativas de <i>C. perfringens</i> y condiciones del tratamiento de ozono combinado con TiO <sub>2</sub> sobre la muestra natural (MN) y sintética (MS). [TiO <sub>2</sub> ]=1 g L <sup>-1</sup> . ....	201
Tabla 6.7. Niveles de las variables en los tratamientos de ozono sobre <i>C. perfringens</i> . ....	203
Tabla 6.8. Niveles de las variables en los tratamientos de ozono sobre <i>C.</i> (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en lugar de TiO <sub>2</sub> ). ....	205
Tabla 6.9. Resultados físico-químicos en el tratamiento de ozonización sobre la muestra natural de <i>Enterococcus</i> sp.....	207
Tabla 6.10. Recuentos de <i>Enterococcus</i> sp. y condiciones del tratamiento de ozonización sobre la muestra natural. ....	208
Tabla 6.11. Resultados físico-químicos en el tratamiento de peroxona sobre la muestra natural de <i>Enterococcus</i> sp.....	209
Tabla 6.12. Recuentos de <i>Enterococcus</i> sp. y condiciones del tratamiento de peroxona sobre la muestra natural. [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=0,04 mM. ....	209
Tabla 6.13. Resultados físico-químicos en el tratamiento de ozono combinado con TiO <sub>2</sub> sobre la muestra natural de <i>Enterococcus</i> sp. ....	211

Tabla 6.14. Recuentos de <i>Enterococcus</i> sp. y condiciones del tratamiento de ozono combinado con TiO <sub>2</sub> sobre la muestra natural. [TiO <sub>2</sub> ]= 1 g L <sup>-1</sup> . .....	212
Tabla 6.15. Resultados físico-químicos en el tratamiento de O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /TiO <sub>2</sub> sobre la muestra natural de <i>Enterococcus</i> sp. [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=0,04mM. [TiO <sub>2</sub> ]=1 g L <sup>-1</sup> . .....	213
Tabla 6.16. Recuentos de <i>Enterococcus</i> sp. y condiciones del tratamiento de ozono combinado con TiO <sub>2</sub> sobre la muestra natural. [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]=0,04mM. [TiO <sub>2</sub> ]=1 g L <sup>-1</sup> . .....	213
Tabla 6.17. Niveles de las variables en los tratamientos de ozono sobre <i>Enterococcus</i> sp. ....	214
Tabla 6.18. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de las dos formas bacterianas de estudio en el tratamiento de ozonización.....	217
Tabla 6.19. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de las dos formas bacterianas de estudio en el tratamiento de peroxona. ....	218
Tabla 6.20. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de las dos formas bacterianas de estudio en el tratamiento de O <sub>3</sub> /TiO <sub>2</sub> .....	219
Tabla 6.21. Parámetros cinéticos del modelo de Hom, modelo bifásico y modelo de Mafart aplicados sobre la inactivación de <i>Enterococcus</i> sp. en el tratamiento de O <sub>3</sub> /TiO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	219
Tabla 6.22. Coste de los agentes utilizados en los tratamientos de ozonización.....	230
Tabla 6.23. Costes del tratamiento de ozonización, peroxona, O <sub>3</sub> /TiO <sub>2</sub> y O <sub>3</sub> /TiO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> para la inactivación de una unidad logarítmica sobre <i>C. perfringens</i> (células vegetativas) y <i>Enterococcus</i> sp.....	231

## Capítulo 1.

### Introducción y objetivos

---



El aumento de la actividad industrial y el consiguiente desarrollo económico y social han ido produciendo un crecimiento de las grandes ciudades que a su vez, ha ido haciendo más complejo el suministro de uno de los elementos indispensables para la vida, el agua. Habitualmente, los componentes aportados por el medio natural y el uso por parte del hombre generan una contaminación de estas aguas que impide una aplicación directa para un uso determinado sin la corrección previa de algunos de sus parámetros.

Un agua natural que va a servir de abastecimiento puede contaminarse por la recepción de aguas residuales domésticas, aguas residuales de procesos industriales, aguas de escorrentía de zonas agrícolas y vertidos incontrolados. Las alteraciones provocadas por la presencia de contaminantes en las aguas pueden ser de carácter físico, químico y/o biológico. En concreto, este trabajo de investigación se centra en los de tipo biológico, es decir, en microorganismos patógenos que provocan enfermedades como diarrea o gastroenteritis, cólera, legionelosis, etc. Estos contaminantes deben ser eliminados de las aguas naturales que van a ser utilizadas para el abastecimiento a poblaciones en las estaciones de tratamiento de aguas potables (ETAPs), con el fin de asegurar que cumplen los requisitos mínimos que establece la legislación vigente sobre la calidad del agua de consumo humano (RD 140/2003). Según dicha normativa, un agua es considerada “apta para consumo humano” si no contiene ningún tipo de microorganismo o sustancia, en una cantidad o concentración que pueda suponer un peligro para la salud humana. Esta legislación responde al marco comunitario de actuación que establece la Directiva 2000/60/CE en política de aguas, la cual defiende que el agua no es un bien comercial como los demás, sino un patrimonio que hay que proteger, defender y tratar como tal. En consecuencia, se hace imprescindible realizar una correcta gestión del ciclo integral del agua que haga compatible su suministro a toda la sociedad con garantías de calidad.

En consecuencia, el tratamiento de potabilización busca un doble objetivo: la eliminación de microorganismos patógenos (desinfección) y la eliminación de otros contaminantes orgánicos e inorgánicos, perjudiciales para la salud humana.

El cloro es el desinfectante por excelencia utilizado históricamente en el tratamiento de aguas; sin embargo, en 1974 Rook y Bellar descubren que tras clorar aguas naturales se forman subproductos organoclorados nocivos para la salud humana. Posteriormente, se detectan patógenos y otros contaminantes químicos con alta resistencia al cloro a las dosis



que habitualmente se utilizan en la línea de tratamiento convencional en una ETAP (*Payment, 1999*).

Por todo ello, la comunidad científica se centra en la búsqueda de alternativas de desinfección que, integradas en alguna de las etapas de un proceso convencional tanto de depuración, regeneración o potabilización, consigan los efectos de oxidación y/o desinfección requeridos sin la formación de dichos subproductos. En esta línea se desarrollan los Procesos de Oxidación Avanzada (POAs), técnicas basadas en la generación de especies radicalarias oxidativas muy potentes y de ataque poco selectivo, con un elevado poder de oxidación y desinfección sobre los contaminantes y microorganismos presentes en el agua, sin producir en un principio, ningún tipo de subproducto peligroso (*EPA, 1999*). Estas especies pueden ser generadas en distintos procesos haciendo uso de sustancias como el ozono, peróxido de hidrógeno, catalizadores metálicos, radiación solar, etc.

En este marco se plantea el presente trabajo de investigación, cuyo principal objetivo es el estudio de varios tratamientos de oxidación avanzada, aplicables como alternativa o complementación a los procesos convencionales de desinfección y dirigidos a la eliminación de dos indicadores bacterianos de contaminación fecal presentes en aguas naturales y residuales e incluidos en el RD 140/2003, *Clostridium perfringens* (células vegetativas y esporos) y *Enterococcus* sp., con el fin de obtener aguas tratadas de buena calidad.

Este objetivo principal se apoya en los siguientes objetivos secundarios:

- I. Puesta en marcha de una metodología de preparación de una muestra fortificada. Identificación de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp. y determinación de sus concentraciones habituales en las aguas prepotables en la ciudad de Zaragoza.
- II. Estudio de la efectividad de las diversas etapas de un tratamiento convencional de potabilización (cloración, coagulación-floculación y decantación, filtración, adsorción con carbón activo) en la eliminación de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp. a escala real y a escala laboratorial.
- III. Estudio de Procesos de Oxidación Avanzada como tratamientos de agua alternativos de desinfección. Entre ellos se evalúan sistemas basados en ozono ( $O_3$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), dióxido de titanio ( $TiO_2$ ) e irradiación, así como combinaciones entre ellos: peroxona ( $O_3/H_2O_2$ ),  $O_3/TiO_2$ ,  $O_3/H_2O_2/TiO_2$ ,

fotocatálisis (irradiación/TiO<sub>2</sub>), fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estudio de la influencia de variables que pueden afectar al proceso/s.

- IV. Estudio y aplicación de modelos matemáticos primarios sobre los resultados de inactivación de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp. obtenidos en los diferentes tratamientos de desinfección aplicados.

Hasta el momento, la mayoría de las investigaciones referentes a la eliminación de microorganismos mediante POAs han sido realizados sobre el indicador bacteriano *Escherichia coli*, siendo mucho menos estudiados *Clostridium perfringens* y *Enterococcus* sp. Dentro de ellas, son numerosos los estudios llevados a cabo sobre muestras sintéticas basadas en agua destilada o tamponada, sin tener en cuenta la influencia de los componentes orgánicos e inorgánicos del agua natural sobre los procesos. Así mismo, existe escasa bibliografía acerca de los procesos de irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> y O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> centrado en la inactivación de microorganismos, considerados todos ellos en el presente trabajo.

La memoria de esta Tesis Doctoral se estructura en 8 Capítulos y un Anexo.

Tras este primer capítulo **“Introducción y objetivos”**, se presenta en el segundo capítulo **“Control de calidad de las aguas de abastecimiento”**, las normas de calidad microbiológicas de las aguas diferentes según el uso al que son destinadas y los indicadores microbiológicos a analizar para cada uno de ellos. Así mismo, se describen las operaciones realizadas en las plantas de tratamiento de aguas para abastecimiento y las tecnologías de desinfección y oxidación convencionales. Por último, se presentan los fundamentos de los procesos de oxidación avanzada que se van a abordar en este trabajo de investigación.

En el capítulo tres, **“Procedimientos analíticos y de tratamiento de datos”**, se describen los instrumentos, materiales y métodos utilizados para la caracterización físico-química y microbiológica de las muestras de estudio y las herramientas empleadas en el tratamiento de los resultados obtenidos.

En el cuarto capítulo, **“Eliminación de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp. mediante tratamientos convencionales”**, se presenta el estudio de inactivación de *C. perfringens* (células vegetativas) mediante cuatro operaciones convencionales: preoxidación con hipoclorito sódico, coagulación-floculación-decantación, filtración y adsorción con carbón activo, además de estudiar la efectividad de la etapa de cloración sobre las formas esporuladas de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp., comparándolos con los resultados obtenidos

en una ETAP real. Parte de los resultados de este capítulo dan lugar a una publicación científica en la revista *Tecnología del Agua* (Ormad et al., 2008a).

En el capítulo número cinco, **“Eliminación de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp. mediante POAs basados en irradiación”**, se muestra la experimentación llevada a cabo sobre *C. perfringens* (células vegetativas y esporos) y *Enterococcus* sp. a través de los siguientes tratamientos: irradiación, fotocatálisis, irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y fotocatálisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, estudiando además sobre *Enterococcus* sp. la influencia de la radiación ultravioleta B, la intermitencia de la irradiación aplicada y la capacidad de recuperación post-tratamiento. Este capítulo genera dos publicaciones científicas en la revista *Solar Energy*, una en el año 2010 (índice de impacto 2,172) y otra en el 2012 (índice de impacto 2,135) (Lanao et al., 2010, 2012).

En el capítulo seis, **“Eliminación de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp. mediante POAs basados en ozono”**, se presenta el estudio de inactivación de *C. perfringens* (células vegetativas) y *Enterococcus* sp. a través de los tratamientos de ozonización, peroxona, O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> y O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> (este último tratamiento estudiado sólo sobre *Enterococcus* sp.). Los resultados derivados de *C. perfringens* de este capítulo dan lugar a una publicación científica en la revista *Ozone: Science & Technology* (índice de impacto 0,981) (Lanao et al., 2008).

Para concluir, el capítulo número siete recoge las principales **“Conclusiones”** del trabajo y el capítulo ocho contiene la **“Bibliografía”** referenciada a lo largo de la memoria.

La memoria se completa con un **“Anexo”** que compila las publicaciones científicas derivadas del presente trabajo de investigación.

Esta Tesis Doctoral se realiza dentro del grupo consolidado de investigación Calidad y Tratamiento de Aguas y se enmarca en los proyectos de investigación “Aplicación de Técnicas de Oxidación Avanzada en la Potabilización de Aguas Naturales de la Cuenca del Río Ebro” (CTM2005-04585/TECNO) y “Regeneración de aguas depuradas mediante procesos de oxidación avanzada” (CTM2008-01876/TECNO) financiados por la Secretaría de Estado de Universidad e Investigación del Ministerio de Ciencia e Innovación, FEDER y el Gobierno de Aragón-Caixa Catalunya y cuya investigadora principal es la Dra. M<sup>a</sup> Peña Ormad, directora de la presente Tesis Doctoral.

El trabajo llevado a cabo durante esta Tesis Doctoral ha dado lugar, además de las publicaciones previamente mencionadas, a contribuciones en diversos congresos publicadas casi todas ellas en Actas con ISBN, tal y como se muestra a continuación.

**Contribuciones a congresos y publicaciones con ISBN**

- “Effect of Advanced Oxidation Processes on Inactivation of *C. perfringens* with regard to Conventional Chlorination” presentada en el “First International Congress on Green Process Engineering”. Toulouse, 2007.
- “Bactericidal Effectiveness of O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> on *Clostridium perfringens*” presentada en el “2007 World Congress on Ozone and Ultraviolet Technologies”. Los Ángeles, 2007. Publicado en las Actas del Congreso, p. 14-1, 14-11. ISBN 0-9818837-0-2.
- “Effectiveness of Four Types of Disinfectants on *Clostridium perfringens* Viability: NaClO, O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> Comparison” presentada en el “International Conference & Exhibition. Sustainable Agri-Food Industry. Use of Ozone and Related Oxidants”. Valencia, 2007. Publicado en las Actas del Congreso, p. 6.2-1, 6.2-7. ISBN 978-2-9528298-5-4.
- “*Clostridium perfringens* Inactivation in Natural Water by Photolysis and Photocatalysis combined with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>” presentada en el “Ozone & Related Oxidants in: Advanced Treatment of Water for Human Health and Environment Protection”. Bruselas, 2008. Publicado en las Actas del Congreso, p. 6.2.2-1, 6.2.2-8. ISBN 978-2-9528298-6-1.
- “Study of the *Enterococcus* sp. Recovery in Treated Water with TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/sunlight” presentada en el “11th Mediterranean Congress of Chemical Engineering”. Barcelona, 2008.
- “Procesos de oxidación avanzada basados en O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para la eliminación de *Enterococcus* sp. en aguas naturales” presentada en el “XI Congreso de Ingeniería Ambiental”. Bilbao, 2008. Publicado en las Actas del Congreso, p. 91,97. ISBN 978-84-612-6011-9.
- “Advanced disinfection with UV/VIS, TiO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for *Clostridium perfringens* and *Enterococcus* sp. removal” presentada en el “5<sup>th</sup> International Conference/10<sup>th</sup> IOA-EA<sub>3</sub>G Berlin Conference on Oxidation Technologies for Water and Wastewater Treatment”. Berlín, 2009. Publicado en las Actas del Congreso, p. 1,7. ISBN 978-3-89720-990-9.



## Capítulo 2.

### Control de calidad de las aguas de abastecimiento

---



## 2.1. Contaminación microbiológica de las aguas

### 2.1.1. Gérmenes patógenos de transmisión hídrica

Un microorganismo es un ser vivo tan pequeño que sólo puede ser visualizado mediante un aparato óptico, el microscopio. Son organismos dotados de individualidad que presentan una organización biológica elemental. Los microorganismos constituyen un grupo extraordinariamente heterogéneo de seres microscópicos integrado por bacterias, hongos, protozoos, algas microscópicas y virus (*Tortora et al., 2007*).

Las **bacterias**, microorganismos objeto de estudio del presente trabajo de investigación, son organismos unicelulares con una estructura celular primitiva. Su tamaño es diverso en función de la especie variando desde 0,1-0,2  $\mu\text{m}$  de ancho a 5-10  $\mu\text{m}$  de largo, aunque hay bacterias grandes que alcanzan 0,5 mm de largo (*Madigan et al., 2003*). Sus formas también son variadas, lo que permite su identificación y clasificación. Algunas bacterias tienen la capacidad de formar esporos. El espora es un elemento de protección frente a radiaciones, desecación, temperatura, altas presiones y frente a la entrada de sustancias químicas. El fenómeno de esporulación bacteriana está codificado a nivel genético y representa una etapa inactiva cuya durabilidad permite a la célula sobrevivir largos periodos de tiempo hasta que de nuevo encuentra un medio idóneo que le permita activarse de nuevo.

Debido al gran número y diversidad de especies bacterianas, el bacteriólogo danés Christian Gram, en 1884, ideó una técnica de tinción diferencial como primer paso en la diferenciación bacteriana. De esta manera, se establecen dos grandes grupos bacteriológicos: las bacterias Grampositivas, que se visualizan de color azul-violeta y las bacterias Gramnegativas, cuyo color es rojo-rosáceo. Los fundamentos de esta técnica se basan en la diferencia estructural existente entre las paredes celulares de las bacterias Grampositivas y Gramnegativas, tal y como se observa en la Figura 2.1. La pared celular de las Grampositivas posee una gruesa capa de peptidoglicano o mureína, principal componente de la pared, formado por finas láminas de dos derivados de azúcares, N-acetil-glucosamina y ácido N-acetilmurámico y un pequeño grupo de aminoácidos. Por el contrario, la capa de peptidoglicano de las Gramnegativas es delgada y se encuentra unida a una segunda



membrana plasmática externa. Este peptidoglicano es la clave de la tinción de Gram, cuya técnica se desarrolla con detalle en el apartado 3.3.1.8 de la presente memoria.

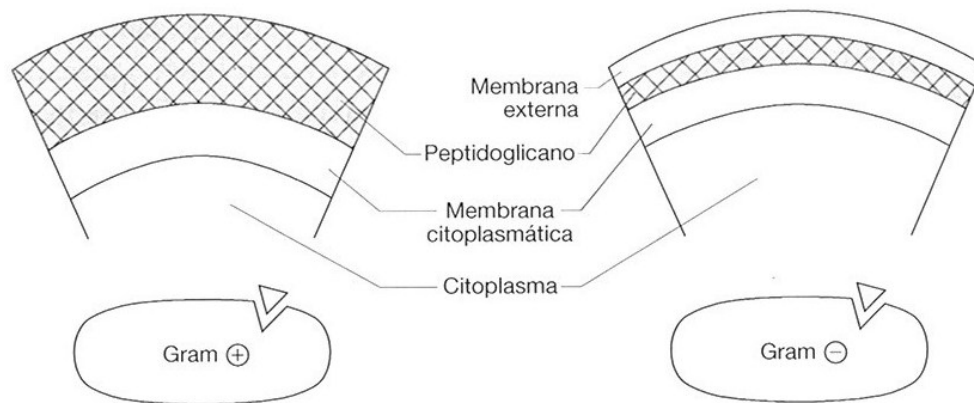


Figura 2.1. Composición estructural de la pared celular de una bacteria Grampositiva y una Gramnegativa (Gamazo *et al.*, 2005).

Los **virus** son macromoléculas de ácido nucleico (desoxirribonucleico (DNA) o ribonucleico (RNA)) rodeadas por una cubierta protectora proteica. Se consideran formas vivas sólo cuando infectan a una célula y adquieren la capacidad de reproducirse, atributo clave de los sistemas vivos. Su tamaño oscila desde 20 a 300 nanómetros, siendo necesaria microscopía electrónica para su visualización y estudio. Pueden atravesar filtros que permiten la retención de bacterias e infectar a personas, animales, plantas o incluso bacterias (bacteriófagos) (Madigan *et al.*, 2003). Al contrario que las bacterias, los virus no están presentes en el ser humano de manera natural. Cuando las personas enferman por causa de un virus, generalmente se eliminan del cuerpo humano en grandes cantidades mediante las heces.

Los **protozoos** son microorganismos unicelulares. La mayoría son de vida libre y pueden encontrarse en el agua de manera natural; sin embargo, varias especies son parásitas y viven de sus hospedadores. En condiciones difíciles se encuentran en forma de quistes o huevos. Los huevos de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* son los más comunes en aguas con presencia de contaminación fecal. Ambos protozoos son muy persistentes en el medio ambiente y muy resistentes a los tratamientos convencionales de desinfección (Venczel *et al.*, 1997; EPA, 1999).

El agua, por naturaleza, contiene sustancias nutritivas que permiten el desarrollo de estos microorganismos. Sin embargo, los requerimientos de nutrientes de cada microorganismo son diversos y también la forma de verse afectados por las condiciones del medio donde se hallen. El agua presente en la atmósfera, al caer en forma de precipitación (lluvia, nieve,...), arrastra partículas en suspensión y microorganismos presentes en el aire, así como en la superficie del suelo. El agua natural superficial, tanto dulce como salada, recoge microorganismos presentes en residuos urbanos e industriales, actividades ganaderas y agrícolas, etc. Las aguas subterráneas están menos contaminadas, puesto que los microorganismos se eliminan durante el proceso de filtración a través del terreno (*Jay et al., 2005*). La interconexión existente entre agua y suelo es la que facilita que diversas bacterias puedan coexistir entre ambos hábitats diferentes. En consecuencia, los microorganismos que se encuentran en el agua pueden ser autóctonos (propios del agua) y alóctonos (procedentes del suelo, aire, animales o del hombre). Los microorganismos habitualmente presentes en el agua tienen una temperatura media de crecimiento de 22 °C, mientras que los procedentes del intestino del hombre y otros animales crecen mejor a temperaturas entre 37 y 44 °C. Este factor es importante para su aislamiento en el laboratorio.

La epidemia de cólera que tiene lugar en Londres en 1854 y que provoca la muerte de 10.000 personas, representa el primer caso constatado que permite asociar el origen de las enfermedades entéricas con la transmisión de agentes patógenos vehiculados por el agua (*Bates, 2000*). Desde entonces, se reconoce el medio hídrico como uno de los modos de vehiculación más frecuente de enfermedades. Cuando abandonan a su huésped, los microorganismos van perdiendo progresivamente su viabilidad y su carácter infeccioso. Esa pérdida es, en general, exponencial y transcurrido un cierto periodo, el patógeno deja de ser detectable. Aquellos que muestran una baja persistencia deben hallar rápidamente un nuevo huésped y es más probable que se difundan por contacto de persona a persona, debido a una insatisfactoria higiene personal o por manipulación de alimentos, que a través del agua de bebida. Por tanto, los patógenos más comunes en el medio hídrico son los que poseen un alto carácter infeccioso o son muy resistentes fuera del organismo. Los virus y los parásitos en fase inactiva (quistes, ooquistes, huevos) no pueden multiplicarse en el agua (*OMS, 1995*).

Las enfermedades más conocidas de origen bacteriano, parasitario y vírico transmitidas por el agua se incluyen en las Tablas 2.1, 2.2 y 2.3.

Tabla 2.1. Enfermedades bacterianas de transmisión hídrica (EPA, 1999).

Agente	Enfermedad	Síntomas
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	Fiebre tifoidea y paratifoidea	Dolor de cabeza, pérdida de apetito, diarrea o estreñimiento, fiebre continuada
<i>Shigella</i> spp.	Disentería bacilar	Diarrea, fiebre, tenesmos, heces mucosas y sanguinolentas
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera	Diarrea, vómitos, sed, coma
<i>Francisella tularensis</i>	Tularemia	Comienzo agudo con dolores y fiebre; postración
<i>Brucella melitensis</i>	Brucelosis	Fiebre irregular, sudores, dolor en músculos
<i>Leptospira interrogans</i>	Leptospirosis	Fiebre, dolores de cabeza, náuseas, vómitos, sed, postración
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infecciones de oído	Otitis en bañistas de aguas contaminadas
<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena	Gastroenteritis	Diarrea acuosa, náuseas, postración y deshidratación

Tabla 2.2. Enfermedades parasitarias de transmisión hídrica (EPA, 1999).

Agente	Enfermedad	Síntomas
<i>Entamoeba histolytica</i>	Disentería amebiana	Diarrea alternante con constipación, disentería crónica con muco y sangre
<i>Giardia lamblia</i>	Giardiasis	Diarrea intermitente
<i>Naegleria fowleri</i>	Meningoencefalitis	Muerte
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Criptosporidiosis	Diarrea aguda, dolor abdominal, vómitos y fiebre baja
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascariasis	Vómitos, gusanos vivos en heces

Tabla 2.3. Enfermedades víricas de transmisión hídrica (EPA, 1999).

Grupo	Subgrupo	Cambios patológicos en pacientes
Enterovirus	Poliovirus Coxsackie-virus Echovirus	Destrucción de motoneuronas, inflamación de las meninges, viremia y multiplicación viral, dilatación y ruptura de vasos sanguíneos
Adenovirus		Invasión viral de células de la mucosa, de nodos linfáticos, de células respiratorias
Hepatitis		Invasión de células del parénquima

Los agentes patógenos tienen diversas propiedades que los distinguen de otros contaminantes del agua de consumo, aspectos que hay que tener en cuenta al aplicar los tratamientos de desinfección (*Pérez y Espigares, 1999*):

- Son componentes que no están disueltos en el agua.
- Con frecuencia forman agregados o se adhieren a sólidos en suspensión presentes en el agua, lo que puede influir en la disminución de la efectividad de los tratamientos aplicados.
- La probabilidad de que el ataque de un patógeno tenga éxito, derivando en infección, depende de su carácter invasivo y de la virulencia del patógeno, así como de la inmunidad de la persona expuesta.
- Si la infección se asienta, los agentes patógenos se multiplican en el hospedador. Algunas bacterias también son capaces de proliferar en alimentos o bebidas, lo cual aumenta las posibilidades de infección.

### **2.1.2. Indicadores microbiológicos de contaminación fecal**

En el control de calidad de las aguas resulta imprescindible realizar un análisis bacteriológico, sobre todo si ésta va a ser destinada a agua de abastecimiento.

La gran variedad de agentes nocivos que pueden encontrarse en una muestra de agua así como su baja concentración y la complejidad de la mayor parte de las técnicas de aislamiento y análisis y el elevado coste, hacen que el control frecuente de todos aquellos patógenos con importancia sanitaria sea una práctica poco factible. Por ello, la rutina de los análisis microbiológicos en el agua está basada en la detección de microorganismos asociados que comparten los mismos hábitat, pero cuya detección y aislamiento es más viable desde un punto de vista técnico y económico. Estos microorganismos se conocen como indicadores de contaminación fecal y se eligen de acuerdo a unos criterios (*Borrego et al., 1990*):

- ser fáciles de aislar y cultivar en el laboratorio
- estar presentes siempre que existan agentes patógenos entéricos
- ser relativamente inocuos para el hombre
- ser integrantes de la microbiota intestinal
- no multiplicarse en aguas naturales generando un valor superior al real

- mantener un grado de eliminación durante el tratamiento similar al de los patógenos

Ningún microorganismo reúne todas estas propiedades, por lo que no existe un indicador ideal. Los indicadores que tradicionalmente se han utilizado y se siguen utilizando en la actualidad son indicadores bacterianos. En la Tabla 2.4 se incluyen las normas de la Organización Internacional de Normalización (ISO) para la detección y el recuento de bacterias indicadoras fecales en el agua y sus homólogas en España, editadas por la Asociación Española de Normalización y Certificación, adaptadas como normas UNE (AENOR, 1997).

Recientes investigaciones están poniendo de manifiesto carencias en el proceso de evaluación de la calidad microbiana de las aguas para consumo humano en base a este tipo de indicadores bacterianos; se ha demostrado la presencia de virus, ooquistes y quistes de protozoos y esporos bacterianos en muestras de agua, en ausencia de los indicadores fecales (Gesche *et al.*, 2003). En consecuencia, la presencia de estos indicadores en aguas indica contaminación fecal, pero su ausencia no garantiza necesariamente la calidad higiénica de ésta (Moriñigo *et al.*, 1990). Hay científicos que defienden la necesidad de establecer otros indicadores complementarios como indicadores de aguas tratadas (Payment *et al.*, 1985).

Según el destino final al cual se dirige un tipo de agua, los indicadores bacterianos objeto de análisis van a ser diferentes. A continuación, se describen los indicadores más comúnmente analizados en el marco del control de la calidad de las aguas.

El grupo de los coliformes lo constituyen bacterias Gramnegativas habituales de la región intestinal de mamíferos y aves. Se caracterizan por su capacidad de fermentación de lactosa a 35-37 °C. Géneros que forman parte de este grupo son *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* y *Edwardsiella*. Pueden existir como saprófitos independientes o como microorganismos intestinales, excepto el género *Escherichia* que sólo puede ser fecal. Por tanto, se pueden diferenciar los coliformes totales que comprenden todos los coliformes de cualquier origen y los coliformes fecales, que designan sólo a los coliformes de origen exclusivamente intestinal, con la capacidad adicional de fermentar la lactosa también a 44,5 °C.

Tabla 2.4. Normas de la ISO y AENOR para la detección y recuento de bacterias indicadoras fecales en agua.

Norma ISO	Norma UNE	Título (calidad del agua)
6461-1:1986	UNE-EN 26461-1	Detección y recuento de esporas de organismos anaeróbicos reductores del sulfito (clostridia) - Parte 1: método de enriquecimiento en un medio líquido.
6461-2:1986	UNE-EN 26461-2	Detección y recuento de esporas de organismos anaeróbicos reductores del sulfito (clostridia) - Parte 2: método de la membrana filtrante.
7704:1985	UNE-EN 77075:1991	Evaluación de los filtros de membrana utilizados para los análisis microbiológicos.
7899-1:1984	UNE-EN ISO 7899-1:1999	Detección y recuento de estreptococos fecales - Parte 1: método de enriquecimiento en un medio líquido.
7899-2:2000	UNE-EN ISO 7899-2:2001	Detección y recuento de enterococos intestinales - Parte 2: método de la membrana filtrante.
6222:1999	UNE EN ISO 6222:1999	Enumeración de microorganismos cultivables - Recuento de colonias a 22 °C.
9308-1:2000	UNE-EN ISO 9308-1:2001	Detección y recuento <i>E. coli</i> y bacterias coliformes – Parte 1: método de la membrana filtrante.
9308-2:1990		Detección y recuento de organismos coliformes, organismos coliformes termorresistentes y presuntos <i>Escherichia coli</i> – Parte 1: método de los tubos múltiples (número más probable).
9308:3-1998	UNE-EN ISO 9308-3	Detección y recuento de <i>Escherichia coli</i> y bacterias coliformes en aguas superficiales y aguas residuales. Parte 3: Método miniaturizado (Número Más Probable) por siembra en medio líquido

*Escherichia coli* es uno de los microorganismos más comunes del tracto intestinal humano y animal y uno de los más estudiados en microbiología. En 1895, Smith sugirió una prueba para este microorganismo como índice de contaminación fecal, estableciendo que su presencia en agua indica contaminación reciente. La mayoría de las investigaciones realizadas con los diversos métodos de desinfección existentes y novedosos son realizadas sobre *E. coli*, si bien se está cuestionando su aptitud como indicador microbiológico de

contaminación fecal. Hay investigaciones que apoyan su uso sólo como indicador de origen exclusivamente bacteriano (Moriñigo *et al.*, 1990; Casteel *et al.*, 2000).

El recuento de colonias a 22 °C engloba a microorganismos capaces de crecer y formar colonias sobre un medio de cultivo poco selectivo a esa temperatura. Su estimación es útil para evaluar el estado de la calidad de las aguas y la eficacia de los procesos de tratamientos del agua. El principal interés de este recuento reside en la posibilidad de detectar cambios en relación a los números esperados, basándose en un control frecuente y a largo plazo. Todo aumento repentino del número obtenido puede advertir anticipadamente la existencia de un foco serio de contaminación.

*Salmonella* spp. es una bacteria Gramnegativa que está ampliamente distribuida en la naturaleza, siendo el hombre y los animales los principales reservorios. Todas las especies de este género se consideran patógenas para los seres humanos, causando enfermedades gastrointestinales. Se ha constatado que su susceptibilidad a la desinfección es similar al grupo bacteriano coliforme (Health Canada, 2006).

A diferencia de los patógenos más comunes vehiculados por el agua, la bacteria *Legionella* está presente de manera natural en el medio acuático y sobrevive bajo un amplio rango de condiciones, incluyendo temperaturas entre 0-63°C y un rango de pH entre 5-8,5, aunque generalmente, la concentración presente en el agua es baja en comparación con las cantidades que alcanza en las instalaciones construidas por el hombre. Los tratamientos convencionales de potabilización consiguen eliminar la *Legionella* presente en el agua, aunque son necesarios tiempos de contacto y dosis de desinfectante mayores que para *E. coli*, a excepción de cuando se utilizan cloraminas (Health Canada, 2006).

*Enterococcus* sp. y *Clostridium perfringens* son los indicadores bacterianos objeto de estudio del presente trabajo de investigación, por lo que se describen de manera más amplia a continuación.

*Enterococcus* sp., genéricamente denominados enterococos intestinales, son bacterias cocáceas Grampositivas, anaerobias facultativas. No forman esporos y son relativamente tolerantes al cloruro de sodio y a niveles de pH alcalinos. Tienden a unirse por parejas o formando cadenas cortas. Dentro de este género se incluyen las especies *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* y *Enterococcus irae*. La mayoría de las especies de enterococos no se multiplican en los ambientes acuáticos (OMS, 2011).

El número de enterococos intestinales en heces humanas es generalmente más bajo que el número de *E. coli*. Presentan como características la tendencia a sobrevivir más tiempo en el medio acuático que *E. coli* y una mayor resistencia a la desecación y a la cloración. Por ese motivo se usan como indicadores de patógenos fecales en los análisis de aguas naturales y aguas de bebida, como test complementario al control de *E. coli* (OMS, 1995).

*Clostridium perfringens* es la especie más habitual en aguas dentro del grupo de las bacterias anaerobias sulfito-reductoras. El origen de los anaerobios sulfito-reductores no es exclusivamente fecal, ya que pueden encontrarse en múltiples lugares. Son bacterias telúricas (habitantes del suelo) ampliamente distribuidas en la naturaleza (suelo, polvo, sedimento marino, etc.) que se encuentran también en el intestino de hombres sanos, así como en ganado porcino y bovino. Pero a su vez, es patógeno para los animales (produce enterotoxemias) y para el hombre (genera toxiinfecciones alimentarias mediante *C. perfringens* tipo A y enteritis necrótica a partir de *C. perfringens* tipo C). Su poder patógeno radica en la posibilidad de elaborar potentes exotoxinas de acción hemolítica, proteolítica y edematizante, en la producción de gas y en su acción necrosante sobre los tejidos.

*C. perfringens* se caracteriza por ser un bacilo Grampositivo, anaerobio, inmóvil y formador de esporas ovales subterminales y no deformantes, presentes normalmente en las heces, aunque en número mucho más reducido que *E. coli*. A nivel metabólico reducen nitratos a nitritos, producen H<sub>2</sub>S (característica importante a la hora de su diferenciación en el medio de cultivo), fermentan rápidamente la lactosa y otros azúcares (con producción de ácido y gas), producen lecitinasa y elaboran toxinas de varios tipos A, B, C, D y E.

La característica más importante de este grupo indicador es que sus esporos sobreviven en el agua mucho más tiempo que los coliformes y pueden ser resistentes a los tratamientos de desinfección convencional si no se realizan de manera adecuada (Hirata *et al.*, 1991). Los esporos son estructuras de resistencia que permiten resistir situaciones adversas que destruirían a la célula vegetativa. La estructura de un espora bacteriano incluye el núcleo, la membrana plasmática, la pared celular, el cortex y la capa esporógena interna y externa. Esta capa esporógena está formada principalmente de proteínas con pequeñas inclusiones de lípidos y carbohidratos. Estas capas les confieren resistencia frente a los agentes externos, entre ellos, los desinfectantes químicos (Fernando y Othman, 2006). Por ello, su análisis después del tratamiento permite evaluar la eficacia de eliminación de agentes



patógenos resistentes y alertar de deficiencias en el proceso de potabilización (*Payment, 1999; Hijnen et al., 2000a*).

En la Tabla 2.5 se muestran referencias descritas en la literatura científica que recomiendan esta bacteria como indicador de contaminación fecal, incluyendo virus y ooquistes de *Cryptosporidium*.

Tabla 2.5. Referencias sobre *C. perfringens* como indicador adecuado de patógenos resistentes.

Autor	Microorganismo relacionado	Condiciones experimentales
<i>Hirata et al., 1991</i>	Microorganismos en general	Depuradora y línea de fangos
<i>Payment et al. 1985, 1993</i>	<i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i> , virus entéricos	Potabilizadora
<i>Medema et al., 1997</i>	<i>Cryptosporidium</i>	Agua natural
<i>Casteel et al., 2000</i>	Ooquistes <i>Cryptosporidium</i>	Potabilizadora y depuradora
<i>Galofré et al., 2004</i>	Oosquistes <i>Cryptosporidium</i>	Potabilizadora

La presencia de cloro en el agua inactiva rápidamente bacterias indicadoras como *E. coli* y coliformes, pero deja gran parte de patógenos resistentes prácticamente sin afectar durante varias horas (*Payment, 1999*). Esto crea un falso sentido de seguridad al darse resultados negativos sobre coliformes y *E. coli* a las autoridades competentes responsables de los análisis microbiológicos del agua. Quistes de *Giardia*, ooquistes de *Cryptosporidium* y virus humanos entéricos son mucho más resistentes a los desinfectantes, por lo que constituyen un mayor riesgo para la salud.

Cuando *E. coli* y los enterococos fecales están ausentes, la presencia de *C. perfringens* (células vegetativas y/o esporos) indica contaminación remota o intermitente debido a su longevidad y persistencia. Estudios que relacionan microorganismos patógenos con indicadores de contaminación fecal señalan a *C. perfringens* como uno de los indicadores que mejores coeficientes de correlación tiene con aquellos (*Moriñigo et al., 1990*).

### 2.1.3. Normas de calidad microbiológica en aguas

La Ley 14/1986 General de Sanidad establece la obligación de las Administraciones públicas sanitarias de orientar sus actuaciones prioritariamente a la promoción de la salud y

la prevención de las enfermedades. Es por ello que las actividades y productos que, directa o indirectamente, puedan tener consecuencias negativas para la salud deben ser sometidos a un control sanitario. En lo que respecta al uso al cual va a ir destinado un suministro de agua, las normas de calidad microbiológica exigidas son más o menos estrictas. En la Tabla 2.6 se muestran los indicadores que deben analizarse obligatoriamente según el marco legislativo vigente para cada uso del agua.

La Orden del 11 Mayo de 1988 relativa a las aguas prepotables establece la obligatoriedad de controlar coliformes fecales y totales, estreptococos fecales y *Salmonella* spp. para clasificar las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable en categoría A1, A2, A3 o peor que A3. Salvo el parámetro *Salmonella*, que tiene asociado un valor imperativo, el resto de parámetros microbiológicos cuentan con valores indicativos deseables.

La Directiva 2006/7/CE relativa a la gestión de la calidad de las aguas de baño establece obligatorio realizar el recuento de *E. coli* y enterococos. En función de los resultados, el agua posee una calidad suficiente, buena o excelente.

En la Directiva 2006/113/CE sobre las aguas destinadas a la cría de moluscos, se establece la recomendación de realizar el control de coliformes fecales, para los cuales sólo hay valores guía. A pesar de ello, la legislación subraya que a la espera de una directiva relativa a la protección de los consumidores sobre esta clase de productos, ese valor debería ser obligatoriamente respetado en aquellas aguas en las que habiten los moluscos directamente comestibles.

En lo referente a la calidad exigida en las aguas aptas para peces, la Directiva 2006/44/CE no indica ningún parámetro microbiológico a controlar.

En el Real Decreto 140/2003, transposición al marco legislativo español de la Directiva 98/83/CE, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, se establecen como parámetros microbiológicos de obligado análisis *E. coli*, enterococos y *Clostridium perfringens* (incluidos los esporos). El recuento de colonias a 22 °C y de coliformes son sólo parámetros indicadores. En el caso de incumplimiento de estos parámetros indicadores, la autoridad sanitaria valora la calificación del agua como “apta o no para el consumo humano” en función del riesgo para la salud.

Finalmente, el RD 1620/2007 establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. En la Tabla 2.7 se indican los parámetros microbiológicos que se deben analizar en este tipo de aguas, en función del uso al cual van a ir destinadas. *E. coli* y nemátodos (al menos los géneros *Ancylostoma*, *Trichuris* y *Ascaris*) deben ser analizados para todos los usos establecidos. El análisis de *Legionella* también es obligatorio para todos los usos de agua establecidos salvo para el uso ambiental, que no contempla su control. *Salmonella* spp. únicamente es contemplada en las aguas regeneradas con fines agrícolas e industriales. Por último, controlar *Taenia saginata* y *Taenia solium* es obligatorio si el agua se destina a regar pastos para consumo de animales productores de carne, ya que son los hospedadores intermedios de estos parásitos.

Tabla 2.6. Normas de calidad microbiológica en aguas continentales, en función de su uso.

Parámetros microbiológicos (UFC·100 mL <sup>-1</sup> )	Calidad aguas prepotables Orden 11 Mayo 1988			Calidad aguas de baño continentales D 2006/7/CE			Calidad aguas cría moluscos D 2006/113/CE	Calidad aguas potables RD 140/2003
	A1	A2	A3	Calidad Excelente	Calidad buena	Calidad suficiente	Valor guía	
<b>Coliformes totales 37°C</b>	50	5.000	50.000					
<b>Coliformes fecales</b>	20	2.000	20.000				300 en la carne de moluscos y en el líquido intervalvar	
<i>Escherichia coli</i>				500	1000	900		0
<b>Bacterias coliformes</b>								0
<b>Estreptococos fecales</b>	20	1.000	10.000					
<b>Enterococos</b>				200	400	330		0
<i>Salmonella spp.</i>	Ausencia en 5 L	Ausencia en 1 L						
<b>Recuento colonias 22°C</b> - a la salida de ETAP -en red de distribución								- 10.000 - sin cambios anómalos
<i>C. perfringens</i> (incluidas las esporas)								0 <sup>(1)</sup>

- (1) Cuando la determinación sea positiva y exista una turbidez mayor a 5 UNF se determinarán, en la salida de ETAP o depósito, si la autoridad sanitaria lo considera oportuno, *Cryptosporidium* u otros microorganismos o parásitos.

Tabla 2.7. Normas de calidad microbiológica en aguas reutilizadas, en función de su uso.

Uso	Real Decreto 1620/2007				
	Nemátodos (huevos/10L)	<i>E. coli</i> (UFC 100mL <sup>-1</sup> )	<i>Legionella</i> spp. (UFC L <sup>-1</sup> )	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Taenia saginata</i> <i>Taenia solium</i>
<b>1. Urbano</b>	1	0 (residencial) 200 (servicios)	100		
<b>2. Agrícola</b>	1	100 (consumo fresco) 1.000 (consumo no fresco y acuicultura) 10.000 (árboles, flores)	1.000 (consumo fresco) No se fija (consumo no fresco y acuicultura) 100 (árboles, flores)	Ausencia (consumo fresco) Ausencia (consumo no fresco y acuicultura) No se fija (árboles, flores)	1 huevo·L <sup>-1</sup> (consumo animales productores carne)
<b>3. Industrial</b>	1	0 (torres refrigeración y conductos evaporación) 1.000 -10.000 (resto)	0 (torres refrigeración y conductos evaporación) 100 (resto usos)	No se fija (torres refrigeración y conductos evaporación) Ausencia (proceso y limpieza industrias agroalimentarias)	
<b>4. Recreativo</b>	1	200 (golf) 10.000 (estanques)	100 (golf) No se fija (resto usos)		
<b>5. Ambiental</b>	1	0 (recarga directa acuíferos) 1.000 (recarga percolación acuíferos)			

## 2.2. Plantas de tratamiento de aguas para abastecimiento

### 2.2.1. Estación de tratamiento de aguas potables

Hoy día es prácticamente inviable una aplicación directa de las aguas naturales sin tener que corregir previamente de las mismas uno o varios parámetros indicadores de calidad. Debido a la elevada cantidad de productos de deshecho que el hombre genera y vierte al cauce natural es necesario que el agua sea sometida a un proceso de potabilización previo a su uso para consumo humano.

A modo de ejemplo, la Tabla 2.8 muestra una relación de microorganismos detectados en aguas del Canal Imperial de Aragón (punto de muestreo 0507 de la red de Control del Estado de las Masas de Agua Superficiales en la cuenca del Ebro), aguas prepotables antes de su entrada a la ETAP de Zaragoza ([www.chebro.es](http://www.chebro.es)).

Tabla 2.8. Microorganismos presentes en aguas del Canal Imperial de Aragón antes de su entrada a la ETAP de Zaragoza.

UFC· 100 mL <sup>-1</sup>	Agua de entrada ETAP
<b>Coliformes fecales</b>	10 <sup>1</sup> - 10 <sup>4</sup>
<b>Coliformes totales a 37 °C</b>	10 <sup>1</sup> - 10 <sup>4</sup>
<i>Escherichia coli</i>	1 – 10 <sup>2</sup>
<b>Estreptococos fecales</b>	10 <sup>2</sup> – 10 <sup>3</sup>
<i>Salmonella</i> (en 1L)	1 – 10

En consecuencia, el tratamiento de potabilización tiene un doble objetivo. Por un lado, la eliminación de microorganismos patógenos (desinfección) y por otro, la eliminación de contaminantes químicos nocivos, tanto de naturaleza orgánica como inorgánica. Estos procesos se llevan a cabo en instalaciones denominadas Estaciones de Tratamiento de Aguas Potables (ETAPs).

La Orden del 11 de Mayo de 1988 establece el marco legislativo para los Estados miembros de la Unión Europea en materia de aguas naturales superficiales destinadas a la producción de agua potable. Define los tratamientos tipo que permiten la transformación de las aguas superficiales, previamente clasificadas en categorías A1,

A2 y A3, en aguas aptas para abastecimiento humano. Los tratamientos recomendados para cada una de las categorías se incluyen en la Tabla 2.9 y la Figura 2.2 esquematiza gráficamente cada una de las etapas y procesos que configuran cada uno de ellos.

Tabla 2.9. Tratamiento recomendado para cada categoría de agua prepotable.

Categoría	Tratamiento
Tipo A1	Tratamiento físico sencillo + desinfección
Tipo A2	Tratamiento físico normal + tratamiento químico + desinfección
Tipo A3	Tratamiento físico-químico intensivo, afino y desinfección

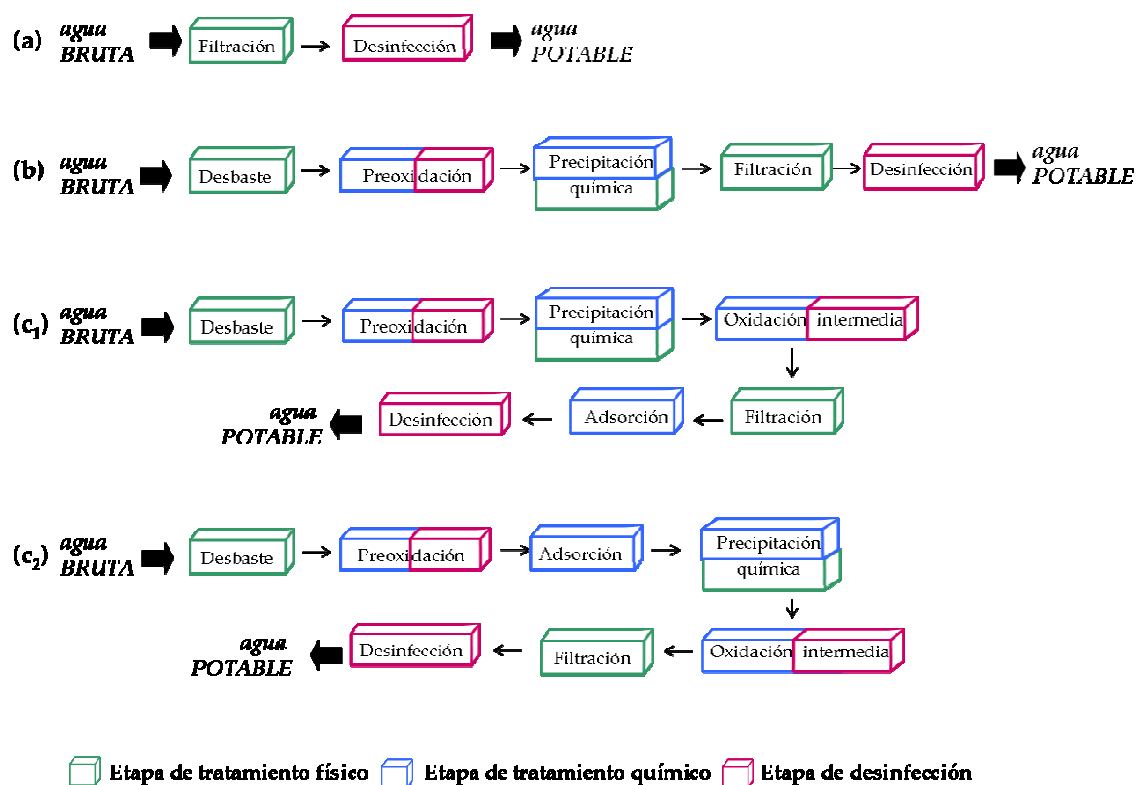


Figura 2.2. (a) Línea de tratamiento simple para un agua bruta de calidad A1. (b) Línea de tratamiento normal para un agua bruta de calidad A2. (c<sub>1</sub> y c<sub>2</sub>) Líneas de tratamiento intensivo para un agua bruta de calidad A3.

Las aguas superficiales que poseen características físicas, químicas y microbiológicas inferiores a los valores límites para someterse a un tratamiento tipo A3 no pueden utilizarse para la producción de agua potable.

La primera barrera con la que se encuentra el agua al entrar en una potabilizadora es la etapa de **desbaste**. Su objetivo es eliminar el material de gran tamaño que arrastra consigo el agua (hojas, ramas,...) mediante un sistema de rejillas y/o tamices. De este modo, se consigue proteger y aumentar la eficacia y operatividad de los elementos posteriores de la planta de tratamiento, evitando obstrucciones en canales, conducciones y tuberías. Después del desbaste grueso, el agua se deja reposar en tanques desarenadores en los cuales se asienta la arena fina y otras partículas pequeñas.

A continuación, el agua pasa por una etapa de **preoxidación** donde se lleva a cabo la desinfección y la oxidación de la mayor parte de la materia orgánica que transporta. Otra de las finalidades que se persigue en esta etapa es oxidar las sustancias amoniacales presentes para evitar el crecimiento de algas en las instalaciones, así como el hierro y manganeso, favoreciendo su posterior precipitación. Este proceso se puede llevar a cabo en una sola etapa (sólo habría una desinfección final), en dos etapas (preoxidación y desinfección final) o en tres (preoxidación, oxidación intermedia y desinfección final) (Figura 2.2).

El compuesto tradicionalmente empleado con fines de desinfección y oxidación es el cloro o derivados. Es fácil de usar y su coste es bajo. Sin embargo, cada vez es más la preocupación por los derivados organoclorados formados como resultado de la reacción del cloro con la materia orgánica presente en el agua (*Rook, 1974*). Los principales compuestos organoclorados son los trihalometanos, compuestos limitados en el efluente de salida de las potabilizadoras por el Real Decreto 140/2003 a una concentración de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , debido a su carácter cancerígeno. Sin embargo, en muchos países en vías de desarrollo, la desinfección con cloro está permitiendo reducir la prevalencia de enfermedades gastrointestinales (*Sobsey et al., 2003*). Con estos mismos fines existen otros productos químicos oxidantes que se pueden emplear como el ozono, el dióxido de cloro o las cloraminas.



La siguiente etapa en la línea de tratamiento es la etapa de clarificación, donde cuatro operaciones (coagulación-floculación, decantación y filtración) se suceden con el objetivo de eliminar la materia en suspensión y coloidal del agua, ya que con un fenómeno de sedimentación por sí solo no sería posible.

El proceso de **coagulación-floculación** consigue desestabilizar a los coloides mediante la adición de agentes coagulantes en el agua, cuyas cargas positivas neutralizan las cargas negativas de los coloides, rompiendo sus uniones y formando así flóculos de mayor peso que pueden sedimentar con mayor facilidad. La coagulación se favorece agitando fuertemente.

El coagulante más utilizado en el tratamiento de las aguas potables es el sulfato de alúmina,  $Al_2(SO_4)_3$ , u otras sales de aluminio que neutralizan las cargas eléctricas de las partículas, reduciendo o anulando las fuerzas que tienden a mantenerlas separadas. El aluminio es poco soluble, no proporciona color ni sabor y no es tóxico al pH del agua potable.

Tras la coagulación tiene lugar el proceso de floculación, en el que se da a las partículas desestabilizadas una mayor cohesión con objeto de que puedan aglomerarse, formar flóculos y sedimentar con más facilidad. La floculación se favorece agitando suavemente. Estos flóculos son eliminados posteriormente en una unidad denominada **decantador**, donde el proceso se ve favorecido dejando el agua en reposo. El agua libre de materia en suspensión pasa a la etapa siguiente mientras que los flóculos sedimentados permanecen en el fondo hasta ser retirados, pasando a constituir parte de los fangos. Los fangos depositados se purgan de manera intermitente y automática y se gestionan posteriormente como residuo.

La **filtración** es el proceso que conduce a la obtención de un agua perfectamente clarificada, haciéndola pasar a través de un medio poroso. Su finalidad es la eliminación de partículas suspendidas, disueltas y coloidales, así como microorganismos que no han sido eliminados en los procesos previos. Para ello, el agua atraviesa un lecho de material granular inerte. Normalmente se utiliza arena silíceo de talla efectiva 0,8 – 1 mm, colocada en un falso fondo perforado. Las alturas del lecho de arena varían entre 1 – 1,2 m y la altura del agua sobre el lecho suele ser del orden de 1 – 1,5 m. Una vez que el filtro se ha obturado de partículas, se procede a su

lavado mediante la inyección de agua a contracorriente o de una mezcla de aire y agua. El aire mueve la arena y el agua arrastra hacia arriba las partículas retenidas, haciendo que salgan del lecho de arena.

La etapa de **adsorción** es una etapa de tratamiento físico que se utiliza principalmente con las aguas de categoría A3. Se basa en la propiedad que tienen algunos materiales sólidos de fijar en su superficie moléculas orgánicas. En el tratamiento de aguas se utiliza habitualmente como agente adsorbente carbón activo. El carbón se activa mediante técnicas químicas o térmicas aumentando su superficie específica, lo que le permite retener fácilmente partículas. En los tratamientos de potabilización, el carbón activo retiene los subproductos organoclorados formados en la preoxidación, aunque indirectamente se adsorben también moléculas de cloro e incluso, microorganismos. Por eso si se realiza esta etapa, es recomendable posteriormente contar con una etapa de oxidación intermedia o final con la finalidad de reforzar el fenómeno de desinfección. La regeneración del carbón, cuando ha perdido su eficacia debido a la gran cantidad de moléculas retenidas, se efectúa en hornos especiales de pirólisis.

El agua, aunque después de ser tratada es normalmente de muy alta calidad, puede verse contaminada en el sistema de distribución por diversas razones. Para evitar que esto ocurra se incluye una etapa de **desinfección final**. Esta etapa tiene una importancia fundamental ya que constituye la última barrera contra la transmisión de enfermedades microbianas vehiculadas a través del agua. Impide el desarrollo de microorganismos patógenos a lo largo del sistema de distribución desde la planta hasta los puntos de consumo. El único agente, hoy por hoy, que asegura una desinfección residual a lo largo de todo el sistema es el cloro. El nivel de cloro libre residual máximo legislado en aguas de consumo humano es  $1 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ .

Es importante que los sistemas de conducción del agua potable estén en perfectas condiciones de mantenimiento para que mantengan una presión positiva en todo momento. Si la presión de agua cae por cualquier motivo y hay conexiones defectuosas o fracturas en las tuberías de conducción, los contaminantes pueden ser aspirados hacia el interior del sistema de distribución. En estos casos, Payment (1999) demuestra que la mayoría de microorganismos resistentes a concentraciones residuales

de cloro, tales como bacterias esporuladas y virus, se muestran levemente afectados por el cloro residual hasta pasadas varias horas.

## 2.2.2. Estación de tratamiento de regeneración de aguas residuales depuradas

Ante la creciente demanda de agua en España y la escasez de recursos hídricos que existe en la actualidad, la reutilización de aguas tratadas en Estaciones de Depuración de Aguas Residuales (EDARs) se plantea como una posible solución para incrementar los recursos existentes.

Según establece la legislación vigente, se entiende por “aguas regeneradas” las aguas residuales depuradas que han sido sometidas a un proceso de tratamiento adicional o complementario que permite adecuar su calidad al uso al que se destinan. Estos tratamientos adicionales se llevan a cabo en instalaciones creadas para ese fin denominadas Estaciones Regeneradoras de Aguas Residuales Depuradas (ERARs).

Las aguas residuales objeto de reutilización son aguas que deben cumplir con las especificaciones marcadas en la Directiva 91/271/CEE sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas, pero en las que todavía existen sustancias que pueden ser contaminantes. Se puede decir que en general, estas aguas se caracterizan por la presencia de gérmenes patógenos, sólidos en suspensión, elevada turbidez, presencia de materia orgánica e inorgánica. La Tabla 2.10 muestra una relación de microorganismos detectados en aguas de salida de depuradoras, así como su concentración habitual (USEPA, 2004).

Tabla 2.10. Microorganismos presentes en aguas residuales urbanas, antes y después del tratamiento de depuración.

Organismos · 100 mL <sup>-1</sup>	Agua residual antes EDAR	Agua residual después EDAR
<b>Coliformes fecales</b>	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	5·10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>
<b>Enterococos</b>	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	2·10 <sup>3</sup> - 5·10 <sup>3</sup>
<b>Virus entéricos</b>	10 <sup>3</sup>	20 - 650
<i>Giardia</i>	0,5 – 10 <sup>4</sup>	5 - 2,3·10 <sup>3</sup>
<i>Ooquistes Cryptosporidium</i>	0,2 – 10 <sup>3</sup>	150

En general, el agua que va a ser reutilizada, si no es sometida a un tratamiento adecuado puede presentar un riesgo sanitario y ambiental y generar problemas de ensuciamiento, corrosión, incrustaciones, obturaciones y crecimiento bacteriano (biofilm) en las instalaciones receptoras.

Actualmente, las tecnologías de tratamiento que se aplican en este campo son muy variadas. El tratamiento mínimo necesario dependerá de la calidad y origen del agua bruta así como del destino y características del agua a tratar. Un esquema de tratamiento de regeneración no difiere en gran medida del que podría representar una planta potabilizadora de agua natural (ver Tabla 2.9 y Tabla 2.11).

Tabla 2.11. Posibles tratamientos de regeneración en función del uso destinado.

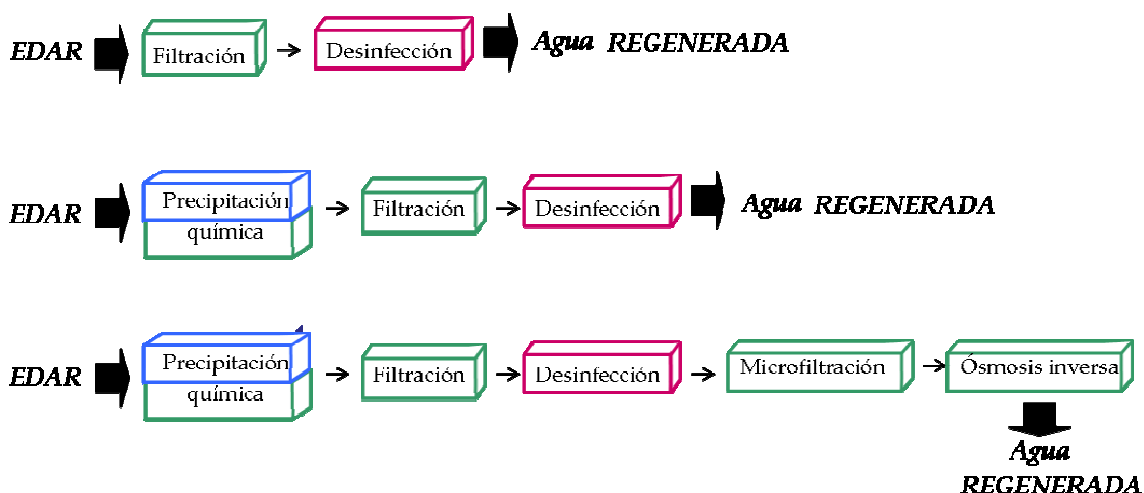
Grado	Tratamiento
Simple	Tratamiento físico sencillo + desinfección
Normal	Tratamiento físico-químico + desinfección
Intensivo	Tratamiento físico-químico intensivo + desinfección+ etapa adicional

El tratamiento más simple puede incluir un sistema de filtración convencional y una posterior desinfección (Figura 2.3). Este sistema elimina parcialmente los sólidos en suspensión presentes y la contaminación microbiológica. La filtración puede tener lugar en un lecho de arena o mediante filtros de malla metálica. Como mecanismo de desinfección en regeneración de aguas es muy utilizada la luz ultravioleta. Sin embargo, la utilización de luz ultravioleta presenta ciertos inconvenientes. Por un lado, si el agua todavía contiene cierta concentración de sólidos, éstos pueden interferir en el proceso de desinfección al crear campos de sombra sobre los cuales la luz UV no actúa, reduciéndose considerablemente su poder desinfectante. Por otro lado, las lámparas son sensibles al ensuciamiento, con lo que su mantenimiento y limpieza debe ser continuo para garantizar una eficiencia. Por último, dado que la luz UV no tiene carácter residual, durante el proceso de almacenamiento del agua tratada podría tener lugar un recrecimiento de los microorganismos. En este sentido, una postcloración garantiza el mantenimiento de su calidad durante el almacenamiento. Esta cloración

debe ser realizada al final del tratamiento puesto que de esta forma se minimiza la formación de subproductos organoclorados, considerados componentes peligrosos por la legislación vigente.

Se puede obtener agua de más calidad si al tratamiento anterior se le añade un proceso de precipitación química (coagulación, floculación y decantación). Una precipitación química previa mediante la adición de coagulantes como sales de hierro, aumenta considerablemente el rendimiento de eliminación de sólidos en suspensión.

Finalmente, un tratamiento intensivo puede agregar a las etapas anteriores filtraciones más precisas mediante membranas de diferente poro, en función de la calidad a obtener, o un fenómeno de saturación de oxígeno si el efluente se quiere devolver al cauce o dirigirlo a fines de riego o conservación de humedales (*Ormad y Calvo, 2010; MARM, 2010*). Las tecnologías de membrana son básicamente procesos de separación; en tratamientos de agua se utilizan principalmente como procesos de desmineralización. Se basan en membranas semipermeables con microporos de tamaño diverso en función del tipo de sustancia a retener. Así surge la microfiltración y ultrafiltración para retirar partículas más grandes y la ósmosis inversa y la nanofiltración para desalinizar el agua (*Spellman y Drinan, 2000*).



Etapa de tratamiento físico Etapa de tratamiento químico Etapa de desinfección

Figura 2.3. Diferentes esquemas de tratamiento de regeneración en ERARs.

## 2.3. Técnicas de desinfección y oxidación convencionales

### 2.3.1. Generalidades

La desinfección de las aguas naturales se puede realizar por métodos diversos, entre los que destacan los agentes químicos (cloro, dióxido de cloro, ozono,...), los físicos (luz, calor) y los medios mecánicos (filtración, sedimentación).

En España, en la mayor parte de las ETAPs, se utilizan como agentes desinfectantes los químicos. Estos agentes deben ser tóxicos para los microorganismos, pero no nocivos para el hombre y los animales, ser solubles en agua o en el tejido celular, tener buena estabilidad, no ser corrosivos ni colorantes, manipulables sin grandes medidas de seguridad, estar disponibles en grandes cantidades a un precio razonable y ser fácilmente medibles y cuantificables en el agua.

La mayoría de los desinfectantes son fuertes oxidantes y/o generan a su vez especies oxidantes como subproductos, como los radicales libres hidroxilo, que reaccionan con los componentes orgánicos e inorgánicos del agua. La principal finalidad del uso de desinfectantes es conseguir la desinfección del agua, pero también son utilizados con otros propósitos como controlar el sabor y olor de ésta, mejorar la efectividad de las siguientes etapas de la línea de tratamiento, prevenir el crecimiento de algas y otros organismos no deseados, etc. (EPA, 1999).

Los agentes desinfectantes van a actuar sobre los microorganismos a tres niveles:

- Dañando su organización estructural tras atacar la capa protectora más externa o alterando la permeabilidad de las membranas
- Interfiriendo en el metabolismo enzimático
- Dificultando el crecimiento celular al interferir en la biosíntesis de componentes regenerativos

La eficiencia en la desinfección dependerá en gran medida de la habilidad del desinfectante para oxidar o romper la pared más externa de la célula y difundirse en su interior e interferir en su actividad metabólica (EPA, 1999).

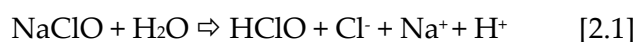
Hay varios factores que influyen sobre el poder bactericida de los desinfectantes, entre los que destacan el estado físico de los microorganismos, la

materia orgánica natural del agua, el pH, la temperatura, la concentración del desinfectante en el agua y el tiempo de contacto entre desinfectante-microorganismo. Como la materia orgánica natural del agua va a ser también oxidada, hay que tener en cuenta una dosis adecuada del producto para satisfacer tanto la inactivación microbiana como los requerimientos de oxidación de los compuestos naturales presentes en el agua. Cada contaminante necesita una dosis y un tiempo de contacto mínimo para su eliminación. Generalmente, a mayores dosis de desinfectante, menor tiempo de contacto es necesario para inactivar la mayoría de los microorganismos (*Etron Ecology, 2001*).

### 2.3.2. Cloro y derivados

Uno de los mayores logros del siglo XX para la humanidad fue poder disponer de agua potable para una gran diversidad de actividades y en consecuencia, poder beneficiarse de una mejor sanidad al prevenir enfermedades que antes provocaban altas mortandades entre la población, muchas de ellas transmitidas por vía hídrica. La desinfección con cloro se ha utilizado desde finales del siglo XIX para proteger los sistemas de abastecimiento y sigue utilizándose en nuestros días con el mismo fin.

El cloro se puede aplicar en forma de cloro gas, hipoclorito sódico e hipoclorito cálcico. El hipoclorito sódico, comúnmente conocido como lejía, se disocia muy bien en el agua formando ácido hipocloroso según la ecuación 2.1. El ácido hipocloroso, a su vez, se disocia en ión hipoclorito conforme a la ecuación 2.2.



En función del pH del medio, la presencia de sales y la temperatura, el cloro molecular, el ácido hipocloroso e ión hipoclorito se encuentran en distinta concentración. Se sabe que a pH <1, una parte importante se encuentra como cloro molecular; hasta pH 8-9 predomina el ácido hipocloroso, habiendo desaparecido todo el cloro molecular y por encima de esos valores, la especie más abundante es el ión hipoclorito (*EPA, 1999*). Si el pH del agua está próximo a la neutralidad, el cloro desarrolla su poder desinfectante y oxidante bajo la forma de ácido hipocloroso. Es la

forma con verdadera acción bactericida pues tiene el mayor potencial de oxidación del cloro (1,49 V) y por tanto, el mayor poder desinfectante.

Si hay presencia de amoníaco en las aguas que se van a clorar, se formarán cloraminas. Las cloraminas también tienen acción desinfectante, aunque inferior al cloro.

El cloro, además de ser un agente oxidante y desinfectante, se utiliza en el tratamiento de las aguas con otras finalidades (EPA, 1999):

- Control de compuestos que dan olor y sabor al agua.
- Prevención de crecimientos de algas y de otros organismos que pueden dañar las instalaciones, como el mejillón cebra y la almeja asiática.
- Oxidación de compuestos inorgánicos como el hierro, el manganeso, nitritos, sulfuros y bromuros.
- Mejora de la eficiencia de las etapas de clarificación del agua.
- Eliminación de plaguicidas y otras sustancias peligrosas (Ormad *et al.*, 2007, 2008b).

Entre los atributos más importantes del cloro se encuentra su poder germicida de amplio espectro, su poder residual en los sistemas de distribución de agua potable, fácilmente medible y controlable y su bajo coste. Hasta el momento es uno de los desinfectantes primarios más utilizados y el desinfectante secundario ideal.

Cho (2010) establece que la inactivación de los microorganismos mediante cloro se produce por la difusión del desinfectante en su interior, atacando componentes celulares internos sin causar un daño importante en la superficie de la célula. Fernando y Othman (2006) indican que las células son capaces de soportar bajas concentraciones de desinfectante una vez en su interior, con motivo del proceso de difusión, hasta que se alcanza una concentración crítica a partir de la cual la viabilidad celular se ve comprometida y comienza su deterioro.

Su principal inconveniente como desinfectante primario radica en la generación de subproductos derivados de la desinfección potencialmente cancerígenos (Rook, 1974). Entre estos subproductos destacan los trihalometanos, sustancias halogenadas volátiles entre las que se encuentran el bromodiclorometano, bromoformo, cloroformo y dibromoclorometano (Cortés *et al.*, 1996; Canche, 2008). Estos



compuestos están limitados en el efluente de salida de las potabilizadoras por la legislación vigente (RD 140/2003) a una concentración límite de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  como sumatorio total. Además, el hipoclorito sódico se degrada con el tiempo y al ser expuesto a la luz; también es bastante corrosivo, por lo que las condiciones de almacenamiento y manejo deben ser adecuadas.

### 2.3.3. Dióxido de cloro

El dióxido de cloro se introdujo a mitad del siglo XX en los tratamientos de agua potable por generar menos problemas organolépticos que el cloro (*Miguel, 2010*).

Es un desinfectante convencional que se genera “in situ” en la planta potabilizadora a partir de clorito sódico, cloro gas y ácido sulfúrico o clorhídrico, debido a su carácter inestable (es explosivo para concentraciones en aire superiores al 10%). Cuando se encuentra en solución acuosa no entraña peligro alguno.

Tiene gran poder bactericida y la ventaja de que no depende del pH, a diferencia del cloro, además de ser aproximadamente diez veces más soluble en agua.

El dióxido de cloro no forma subproductos halogenados típicamente asociados al cloro. Sin embargo, reacciona formando iones cloritos y cloratos como subproductos finales que pueden ser tóxicos a concentraciones elevadas y cuya concentración se debe determinar a la salida de la potabilizadora si se utiliza como desinfectante primario, según establece el RD 140/2003. La EPA (1999) recomienda que la concentración conjunta de dióxido de cloro residual y de sus productos de descomposición, cloritos y cloratos, no supere el valor de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , lo que equivale a dosis totales de dióxido de cloro de  $1,2\text{-}1,4 \text{ mg L}^{-1}$ .

Se aplica sólo como desinfectante primario en las etapas de preoxidación y oxidación intermedia. Como desinfectante final da problemas de sabor y olor. Su potencial de oxidación es  $1,57 \text{ V}$ . Las dosis de dióxido de cloro comúnmente utilizadas como desinfectante en las potabilizadoras varían entre  $0,07$  y  $2 \text{ mg L}^{-1}$ .

El dióxido de cloro, además de ser un agente desinfectante, se utiliza en el tratamiento de las aguas con otras finalidades:

- Oxida los compuestos responsables del sabor y el olor.
- Control sobre el hierro, manganeso y compuestos fenólicos.

- Prevención del asentamiento de larvas de organismos acuáticos generadores de biofouling, como el mejillón cebra y la almeja asiática.

Las ventajas de este compuesto radican en su alto poder oxidante y desinfectante, además de que el pH del medio no condiciona sus propiedades biocidas. Entre los inconvenientes se encuentra, tal y como se ha mencionado previamente, la aparición de cloritos y cloratos como subproductos de su utilización, siendo elevados los costes asociados a su análisis en el laboratorio y la necesidad de generar el dióxido de cloro in situ por ser un gas explosivo y descomponerse fácilmente con la luz solar.

Algunos patógenos presentes en el agua, como *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum*, son resistentes a las concentraciones de cloro que normalmente se utilizan en los tratamientos de potabilización. Se han llevado a cabo pocos estudios sobre la inactivación de estos patógenos con dióxido de cloro; sin embargo, alguno revela que éste tiene un poder oxidante y desinfectante mayor que el cloro libre (Chauret et al., 2001). Su mecanismo de acción es doble, provocando daño en la superficie celular y una degradación de los componentes internos celulares conforme el mecanismo de inactivación avanza (Cho et al., 2010).

#### 2.3.4. Ozono

El ozono es un elemento muy conocido por la protección que proporciona a los seres vivos frente a la radiación ultravioleta del sol. Su primera aplicación técnica se debe al francés De Meriteus en 1886. Desde 1906 se desinfecta mediante ozono el agua del río Vesubio, en Niza. En el siglo XX se extiende su uso no sólo a tratamientos de potabilización de aguas, sino también a tratamientos de aguas regeneradas, desinfección de equipos e instalaciones y aplicaciones en el sector farmacéutico, alimentario y hospitalario (Etron Ecology, 2001; Guzel-Seydim et al., 2004). En estos últimos años el ozono se encamina a la eliminación de disruptores endocrinos y fármacos en aguas residuales, además de colorantes y otras sustancias de carácter peligroso (Ormad et al., 1996; Snyder et al., 2006; Ormad et al., 2009, 2010; Miguel, 2010).

El ozono es un gas de tonalidad azul muy inestable que se descompone rápidamente produciendo oxígeno y que presenta un olor característico. Es un desinfectante muy eficiente y un potente oxidante. Actúa sobre todo tipo de bacterias, virus y protozoos y se estima que su eficacia de inactivación microbiana es alrededor

de 3.000 veces superior a la del cloro. Su potencial de oxidación es 2,07 V y es diez veces más soluble en agua que el oxígeno.

Se genera “in situ” mediante un equipo denominado ozonizador a partir de aire u oxígeno, introduciéndose en el agua a través de difusores porosos, hidroinyectores o torres de contacto.

El ozono, además de ser un potente agente desinfectante, se utiliza en el tratamiento de las aguas con otros propósitos (EPA, 1999):

- Controlar los compuestos responsables del sabor, color y olor.
- Oxidar el hierro, manganeso, sulfuros, fenoles.
- Mejorar el proceso de clarificación del agua y eliminar la turbidez.
- Prevenir el asentamiento de larvas de organismos acuáticos generadores de biofouling, como el mejillón cebra y la almeja asiática.

Entre sus principales ventajas sobre otros desinfectantes destaca la no generación de subproductos organohalogenados cancerígenos al reaccionar con la materia orgánica del agua, salvo si ésta contiene bromuros, formándose entonces compuestos organobromados también peligrosos para la salud humana (Von Gunten, 2003). Requiere tiempos de contacto muy cortos para conseguir una buena desinfección y su actividad no se ve influenciada por el pH.

Entre los inconvenientes, el ozono sólo va a poder ser usado como desinfectante primario en las etapas de preoxidación y oxidación intermedia ya que no tiene poder residual. La estabilidad del ozono depende en gran medida de la matriz acuosa, especialmente su pH y del tipo y contenido de la materia orgánica del agua (Hoigné, 1998). A pH 8, pH habitual del agua natural, la vida media del ozono es inferior a una hora, pasando rápidamente a oxígeno disuelto (Gracia et al., 1999). Este comportamiento limita el uso del ozono como desinfectante residual en la red de distribución de agua potable, ya que en el momento en el que el agua llegara a los primeros usuarios de la red, el contenido en ozono residual sería nulo. Por tanto, debe ser complementado con una etapa de cloración final con la finalidad de prevenir la contaminación microbiana y el desarrollo de biofilms (Gracia et al., 1999).

El ozono, en solución acuosa, puede reaccionar a través de dos vías, directa e indirecta, según las condiciones del medio. En aguas naturales con pH en torno al

neutro, ambos mecanismos de reacción pueden coexistir. Por vía directa actúa a través del ozono molecular, siendo favorecida por pH bajos y por la presencia de “secuestradores” (scavengers) de radicales como iones carbonatos y bicarbonatos (*Hunt y Mariñas, 1999; Cho et al., 2003*). Mientras que si actúa por vía indirecta, lo hace mediante entidades radicalarias formadas en la descomposición del ozono (*Hoigné y Bader, 1983*).

Con objeto de favorecer el mecanismo radicalario del ozono, se pueden añadir sustancias como el peróxido de hidrógeno, radiación UV y catalizadores metálicos (*Oppenländer, 2003*). Esta vía indirecta forma parte de los Procesos de Oxidación Avanzada y se describe más en detalle en el apartado 2.4.2 del presente capítulo.

A nivel estructural, el ozono ataca en primer lugar la superficie celular al reaccionar con los componentes que forman la pared bacteriana. Esta acción deriva en la peroxidación de lípidos y cambios en la permeabilidad de la membrana celular. Hasta que estas reacciones no son completadas, la penetración al interior del citoplasma celular y la reacción directa con los componentes intracelulares están limitadas (*Cho et al., 2010*).

Está bien establecido que la sensibilidad de los microorganismos al ozono se ve afectada por la materia orgánica y los parámetros físico-químicos del agua (*Bezirtzoglou et al., 1997*). Estudios de investigación sobre la efectividad microbicida del ozono señalan que las formas vegetativas de las bacterias son las más sensibles a la acción del ozono, seguidas por los virus y esporos bacterianos y finalmente, los quistes y ooquistes de protozoos (*EPA, 1999*).

### 2.3.5. Radiación solar

La radiación solar es un conjunto de radiaciones electromagnéticas emitidas por el sol, que comprenden desde el infrarrojo hasta el ultravioleta (Figura 2.4). Dentro de este intervalo, el rango ultravioleta (UV) presenta las mejores propiedades de desinfección (*McGuigan et al., 1998; Robertson et al., 2005*). Pero de toda la radiación solar que llega la superficie terrestre, menos del 10 % es luz UV (200-400nm) (*Blanco et al., 2009*). Dentro del espectro UV, el rango UVC y parte del UVB es absorbido por la capa de ozono, por lo que el rango UVA representa el principal fragmento de la radiación solar ultravioleta que llega a la superficie terrestre (*Byrne et al., 2011*).

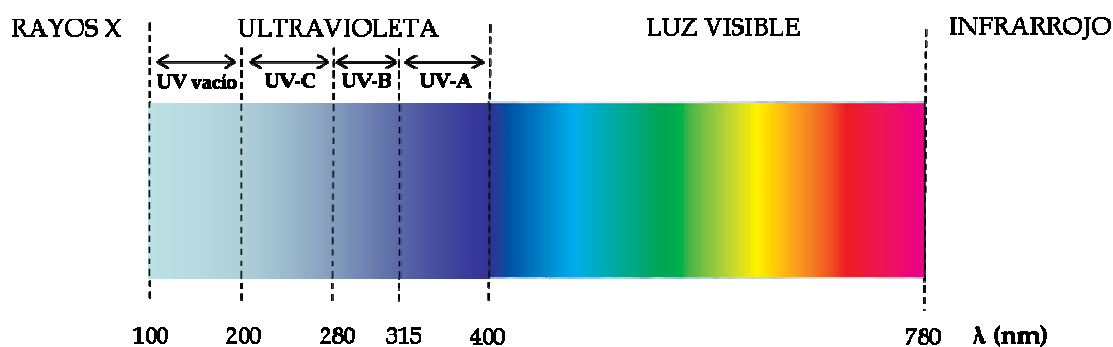


Figura 2.4. Espectro de la radiación UV/VIS.

La desinfección de agua mediante radiación UV se empezó a utilizar desde principios del siglo XX, aunque debido a su elevado coste y a dificultades técnicas esta tecnología no fue inicialmente competitiva en comparación con los desinfectantes químicos. Sin embargo, hoy día la desinfección con radiación UV se está utilizando en la regeneración de aguas residuales, pues esta tecnología no genera organoclorados e inactiva de manera muy eficaz patógenos como bacterias, esporos, virus e incluso protozoos resistentes como *Cryptosporidium* y *Giardia* (Chang *et al.*, 1985; Ormad y Calvo, 2010).

Actualmente, muchos estudios catalíticos se realizan con la luz solar como fuente de radiación UV, bien procedente de lámparas simuladoras de luz solar (Rincón y Pulgarin, 2003; Gumy *et al.*, 2006; Ibarz, 2008; Miguel, 2010), bien mediante colectores solares concentrados (Maldonado, 2000; McLoughlin *et al.*, 2004; Fernández, 2003; Fernández *et al.*, 2005), ya que representan una fuente de luz más barata y de más fácil acceso.

Los mecanismos de desinfección de la radiación solar se basan en la combinación de un fenómeno de calentamiento del agua combinado con la acción fotolítica directa, que además de alterar los componentes moleculares esenciales en sus funciones vitales, activan sustancias fotosensibles presentes en el agua, las cuales reaccionan con oxígeno produciendo especies reactivas con un elevado poder desinfectante (Blanco *et al.*, 2009).

Dentro del espectro solar, los componentes que más afectan a la viabilidad de los microorganismos son el rango UVB, UVA y el rango visible. El rango UVB (280-315

nm) indice directamente sobre el material genético de la célula llegando a impedir su replicación, mientras que el rango UVA (315-400 nm) y visible (400-780 nm) van a participar en la activación de otros agentes presentes, como los catalizadores y componentes oxidantes, influyendo en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Rincón y Pulgarin, 2004b; Robertson et al., 2005).

Esta tecnología presenta numerosas ventajas por ser un método sencillo de utilizar y mantener, ser útil en tiempos cortos de contacto, no generar residuos tóxicos o subproductos y no tener ningún efecto en el gusto y el olor del agua. Sin embargo, este mecanismo sólo puede utilizarse como desinfectante primario por no poseer efecto residual, al ser un desinfectante físico.

La efectividad de la radiación UV de cara a la desinfección depende de la dosis absorbida por los microorganismos, en función de la intensidad de la lámpara utilizada y el tiempo de exposición. Si la dosis no es suficiente, el material genético puede verse dañado pero no destruido, lo que permitirá el recrecimiento bacteriano una vez que el tratamiento haya cesado (Rincón y Pulgarin, 2004a, 2007). Las bacterias contienen complejos sistemas enzimáticos de reparación del ADN dañado por la luz UV llamados sistemas reguladores SOS. Entre estos mecanismos se encuentra la fotorreactivación, activado por la luz visible, que implica entre otras la actuación de la enzima fotoliasa y el mecanismo de reparación en oscuridad, estimulado en ausencia de luz (Gamazo et al., 2005).

Hay que tener en cuenta los factores que pueden reducir la eficiencia de este tratamiento como son la presencia de biofilms sobre la superficie de las lámparas UV, la turbidez y color del agua, la concentración de compuestos orgánicos e inorgánicos disueltos como el hierro, calcio o fenoles, que pueden proteger a las bacterias de la radiación o producir la dispersión de la luz y finalmente, la formación de agregados de microorganismos que pueden dispersar la radiación e impedir su exposición a la luz germicida. La Figura 2.5 resume estas situaciones.

En países en desarrollo, esta técnica se aplica con el nombre de SODIS (solar disinfection). Se ha comprobado que es un tratamiento efectivo en los hogares que carecen de agua potable, siendo práctico y barato. A través del efecto combinado del calentamiento y la radiación UVA solar, los microorganismos patógenos presentes en

el agua almacenada en botellas de politereftalato de etileno (PET) son inactivados en 6 horas después de la exposición a la luz solar (Malato *et al.*, 2009; Byrne *et al.*, 2011).

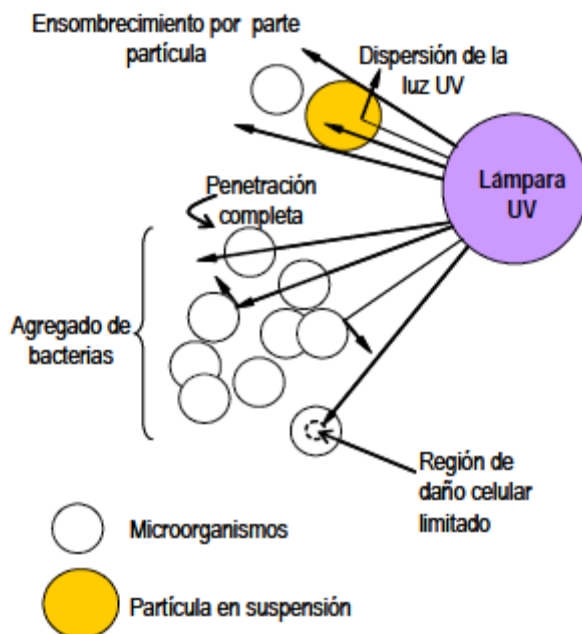


Figura 2.5. Interacciones entre partículas y bacterias, que pueden influir en la desinfección con radiación UV (Ibarz, 2008).

## 2.4. Procesos de oxidación avanzada

### 2.4.1. Generalidades

Los procesos de oxidación avanzada (POAs) nacen como consecuencia de las limitaciones detectadas en la aplicación de los desinfectantes convencionales.

Con el término POA se agrupa a un conjunto de procesos que son capaces de generar especies reactivas de oxígeno (ROS), especies transitorias con alto poder oxidante y de ataque poco selectivo, que degradan la mayor parte de los compuestos orgánicos (incluso lo más persistentes) hasta conseguir su total mineralización o la formación de compuestos intermedios que son más biodegradables que los primeros (Glaze *et al.*, 1987; Peyton y Glaze, 1988; Maness *et al.*, 1999). Las principales ROS generadas por estos procesos son los radicales hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ), los radicales

superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), los radicales hidroperóxido ( $HO_2^{\bullet}$ ) y moléculas de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

Entre los ROS, los radicales hidroxilo son los oxidantes más potentes con un potencial de oxidación de 2,80 V, muy superior al de otros oxidantes tradicionalmente utilizados en tratamientos de agua como son el cloro, dióxido de cloro o el ozono. Su vida media es muy corta, pero suficiente como para poner de manifiesto su carácter oxidante y promocionar reacciones en cadena que dan lugar a otras especies radicalarias libres.

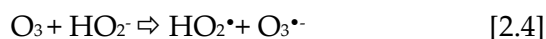
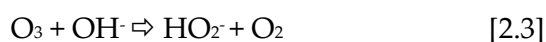
La principal desventaja de estos procesos es su elevado coste.

Hay una gran variedad de POAs, pero a continuación se desarrollan con más profundidad aquellos que son objeto de investigación en el presente trabajo.

#### 2.4.2. Ozonización a alto pH

El ozono, en medio acuoso y bajo determinadas condiciones de operación como pH elevado, exposición a la luz ultravioleta o presencia de peróxido de hidrógeno, es capaz de generar ROS a través de lo que se conoce como “reacciones por vía indirecta” (*Hoigné y Bader, 1977*). Estas reacciones se traducen en la producción de radicales libres hidroxilo por descomposición del ozono (*Hoigné y Bader, 1983*). Este mecanismo radicalario se describe a continuación [ecuaciones 2.3-2.9] (*Tomiyasu et al., 1985; Andreozzi et al., 1999*):

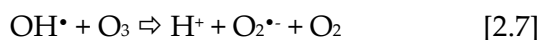
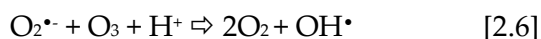
- Etapas de iniciación:



Los iniciadores son compuestos capaces de inducir la formación del ión radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) a partir de una molécula de ozono. Estos compuestos pueden ser inorgánicos como iones hidroxilo ( $OH^-$ ), radicales hidroperóxido ( $HO_2^-$ ) y algunos cationes, o bien orgánicos como el ácido glioxálico, ácido fórmico o sustancias húmicas.



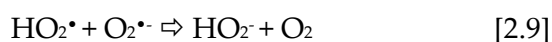
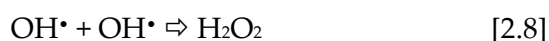
▪ Etapas de propagación:



Los propagadores de las reacciones en cadena por radicales son todas las moléculas orgánicas e inorgánicas capaces de regenerar el ión radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet}$ ) a partir de un radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\bullet}$ ). En esta fase los radicales  $\text{OH}^{\bullet}$  se forman y son consumidos por la molécula de ozono. Los promotores orgánicos más comunes son los compuestos que incluyen grupos arilo, ácido fórmico, ácido glioxálico, alcoholes primarios y ácidos húmicos.

▪ Etapas de terminación:

Comprende todas las reacciones que conducen a una ruptura de la cadena de reacciones.



Los inhibidores son compuestos capaces de consumir radicales hidroxilo ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) sin regenerar el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet}$ ). Los inhibidores más comunes son los iones carbonato y bicarbonato, los grupos alquilo, alcoholes terciarios y sustancias húmicas.

No se conoce todavía demasiado bien cuál es el verdadero mecanismo de la inactivación de los microorganismos mediante el ozono. Algunos investigadores creen que la desinfección con ozono es resultado de la reacción directa molecular (*Hoigné y Bader, 1975, 1978; Finch et al., 1992; Labatiuk et al., 1994; Hunt y Mariñas, 1999*) mientras que otros defienden el mecanismo indirecto como el más importante en la desinfección (*Bancroft., 1984; Cho et al., 2003*).

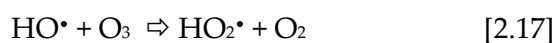
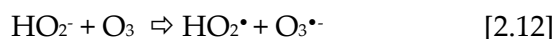
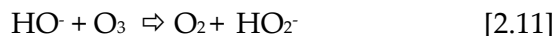
El mecanismo de ataque de los radicales OH sobre los microorganismos se traduce en una oxidación de los componentes estructurales de la pared y membrana celular, similar a como actúa el ozono (*Maness et al., 1999; Huang et al., 2000*). Los radicales OH pueden ser más nocivos sobre los componentes de la superficie celular que el ozono ya que su potencial de oxidación (2,70 V) es superior al del ozono

molecular (2,07 V) y pueden reaccionar no selectivamente con los componentes de la estructura externa de la célula, que en ocasiones se resisten a la acción del ozono (Cho y Joon, 2006).

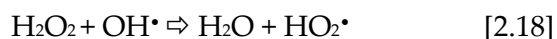
### 2.4.3. Sistema peroxona (O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

El oxidante más comúnmente utilizado en combinación con el ozono es el peróxido de hidrógeno. Esta combinación se denomina sistema peroxona. El peróxido de hidrógeno es un importante iniciador del mecanismo radicalario del ozono, favoreciendo el proceso de ozonización (Glaze *et al.*, 1987; Staehelin y Hoigné, 1982).

Cuando el peróxido está presente, una parte de éste se disocia en radicales hidroperóxido (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>), que tienen una mayor habilidad de iniciación que los iones hidroxilo, acelerando la descomposición de las moléculas de ozono mediante una serie de reacciones en cadena, tal y como se describen en las ecuaciones 2.10-2.17 (Andreozzi *et al.*, 1999).



El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> además de participar activamente en las reacciones con el ozono, también reacciona con los radicales hidroxilo, tal como indican las reacciones 2.18 y 2.19.



En el sistema peroxona, el ozono residual tiene un periodo corto de vida porque el peróxido añadido acelera en gran medida la descomposición del ozono. Cho y Yoon

(2006) recomiendan este sistema cuando el ozono por sí mismo tiene dificultad en la inactivación de patógenos bajo ciertas condiciones, especialmente a bajas temperaturas. También existen estudios que indican que son necesarios largos tiempos de contacto y altas concentraciones de peróxido de hidrógeno para inactivar virus y bacterias (EPA, 1999).

Wolf (1989) establece que la efectividad microbicida de la peroxona depende en gran medida de varios factores, entre los que destacan la relación  $H_2O_2/O_3$ , la dosis de ozono aplicada, la concentración de ozono residual, el tiempo de contacto, la calidad del agua y el tipo de microorganismo estudiado. Destaca la importancia de optimizar la relación  $H_2O_2/O_3$ , porque si se añade una elevada dosis de peróxido de hidrógeno al sistema, se puede reducir la concentración de ozono residual en la muestra además de favorecer el secuestro de radicales hidroxilo libres, en detrimento de la actividad desinfectante del proceso.

#### 2.4.4. Ozonización catalítica

Otras sustancias que pueden favorecer el mecanismo radicalario del ozono son los catalizadores metálicos. Se utilizan óxidos de metales de transición en fase sólida que muestran una alta actividad catalítica ( $MnO_2$ ,  $TiO_2$ ,  $Al_2O_3$ ) (Gracia *et al.*, 1999; Oppenländer, 2003). Entre ellos, el dióxido de titanio presenta la ventaja de no producir disolución de titanio en el agua ozonizada, ya que con un pH mayor que 6, el titanio que se disuelve está por debajo del límite de detección (Paillard *et al.*, 1991).

Gracia (1999) establece que en la ozonización catalítica se producen dos efectos simultáneamente. Por un lado tiene lugar una ozonización de los compuestos disueltos mediante la acción directa del ozono molecular y el ataque indirecto de las especies radicalarias generadas por la descomposición del ozono, y por otro se produce la ozonización de los compuestos adsorbidos en la superficie del catalizador, desarrollándose efectos simultáneos de ozonización y catálisis.

Logemann y Annee (1997) defienden que los fenómenos superficiales en el catalizador durante los procesos de oxidación catalítica son importantes para que se produzca con éxito la desinfección. Para ello, establecen tres acciones:

- En primer lugar se produce la adsorción simultánea del ozono y la materia orgánica o los subproductos de ozonización en la superficie del catalizador.

- Segundo, se produce la descomposición del ozono en los puntos activos del catalizador, generándose especies radicalarias más reactivas que el propio ozono. Estas especies oxidan los compuestos adsorbidos.

- Tercero, los productos finales de la oxidación son desorbidos, pues su afinidad con el catalizador es menor.

Las propiedades químicas de los catalizadores se deben a la existencia de centros activos en su superficie. En el caso concreto del dióxido de titanio, contiene sitios ácidos de Lewis. En medio acuoso, este catalizador es capaz de intercambiar cationes o aniones, generándose una carga positiva o negativa en su superficie, en función del pH de la disolución (*Rincón y Pulgarin, 2004c; Miguel, 2010*).

El proceso de ozonización catalítica requiere menos dosificación de ozono y se ve menos afectado por atrapadores o “scavengers” de radicales presentes de manera natural en el agua, como los hidrogenocarbonatos.

Actualmente, no existen prácticamente estudios de investigación relativos a la aplicación del proceso  $O_3/TiO_2$  en desinfección de aguas.

#### **2.4.5. Fotocatálisis**

En procesos de fotocatálisis la generación de ROS tiene lugar por combinación de un catalizador y luz. Desde que en 1985, Matsunaga y su equipo propusieran un nuevo concepto de esterilización fotoquímica del agua, numerosos trabajos de investigación avalan la efectividad de los procesos fotocatalíticos en la eliminación de compuestos altamente persistentes en agua como los pesticidas utilizados en la agricultura (*Ormad et al, 2010; Miguel, 2010*), antibióticos y otros fármacos (*Elmolla y Chaudhuri, 2009, 2010*) y microorganismos presentes en agua (*Blake et al., 1999; Rincón y Pulgarin 2003, 2007; Chong et al., 2010*).

El catalizador semiconductor más estudiado en la actualidad en los tratamientos de radiación solar es el dióxido de titanio por sus características de alta fotoactividad, bajo coste, estabilidad química y biológica e inocuidad (*Mills et al., 1993*), características que han hecho que haya sido elegido para la realización de este trabajo.

El dióxido de titanio presenta dos zonas electrónicas, la banda de valencia y la banda de conducción, caracterizadas por una alta y una baja densidad de electrones respectivamente. La diferencia de energía entre ambos niveles se denomina salto de

energía. Cuando el catalizador es irradiado con luz UV ( $\lambda < 385$  nm) equivalente al salto de energía, los electrones de la banda de valencia se excitan pasando a la banda de conducción, dejando su respectivo hueco en la banda de valencia. Como consecuencia de esa activación, se generan en la superficie del catalizador estructuras duales electrón ( $e^-$ )/ hueco ( $h^+$ ) (Figura 2.6) [Ecuación 2.20]. A partir de estas estructuras cargadas, se inician reacciones de oxidación y reducción en su superficie. También se puede producir una recombinación de los pares  $e^-h^+$ , por lo que es necesario que exista un oxidante que actúe como aceptor de electrones.

Generalmente, las moléculas de oxígeno presentes en el agua reaccionan con estos electrones generando radicales superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), especies oxidantes intermedias [2.21]. Los huecos, a su vez, reaccionan con moléculas de agua e iones hidroxilo generando radicales hidroxilo [2.22 y 2.23]. Estas especies reactivas de oxígeno (ROS) primarias darán lugar posteriormente a ROS secundarias como los radicales peróxido y moléculas de peróxido de hidrógeno [2.24 - 2.26].

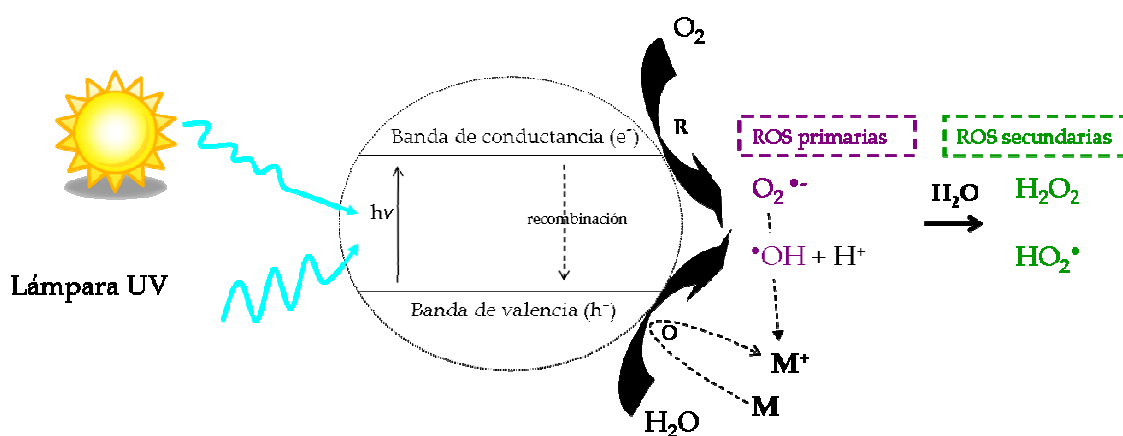
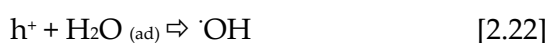
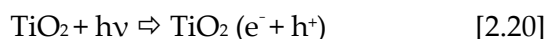
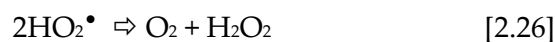
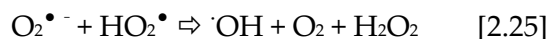


Figura 2.6. Mecanismo de activación fotoinducida del dióxido de titanio con la presencia de microorganismos (M) (Oppenländer, 2003).





Existe mucha información acerca de la efectividad de la fotocatálisis en la desinfección (*Blake, 1999; Malato et al., 2009; Chong et al., 2010*). Sin embargo, no se conoce verdaderamente los mecanismos que conducen a la muerte de los microorganismos. En un primer momento, Matsunaga (1985) propuso que tenía lugar una oxidación directa de la coenzima A, lo que inhibía la respiración celular y derivaba en la muerte de la bacteria. En la actualidad, el principal fenómeno se atribuye a la actuación de radicales hidroxilo (*Ireland et al., 1993; Rincon y Pulgarin, 2003; Cho et al., 2004*) y al resto de ROS (*Maness et al., 1999; Huang, 2000; Cho et al., 2005*). Estas especies radicalarias son capaces de generar estrés oxidativo sobre los microorganismos, siendo la pared externa celular la primera barrera defensiva al ataque de cualquier tipo de agresión (*Maness et al., 1999; Huang et al., 2000*). Una vez superada esta defensa, los radicales ROS atacan la membrana plasmática, compuesta por fosfolípidos y proteínas integrales. Progresivamente, aumenta la permeabilidad de la membrana lo que permite la liberación del contenido intracelular. La rápida pérdida de iones potasio va a influir en una reducción de la viabilidad celular, desequilibrando las funciones vitales y provocando la muerte de la bacteria. También las partículas de  $\text{TiO}_2$  tienen vía libre para introducirse en las células dañadas, lo que lleva al ataque directo de los componentes intracelulares, acelerando su muerte (*Huang et al., 2000*).

Fernández (2003) establece que la interacción del microorganismo con la superficie del catalizador es también un factor esencial para mejorar el grado de inactivación. Las bacterias son más de 30 veces más grandes que las partículas de  $\text{TiO}_2$  (Figura 2.7). Si la carga electrostática del  $\text{TiO}_2$  es predominantemente negativa y la carga en la superficie celular es también negativa, se produce una repulsión electrostática entre las partículas del catalizador y el patógeno y el fenómeno de adsorción no se ve favorecido, siendo en este caso los radicales OH los principales responsables de la desinfección (*Cho et al., 2005*). Los microorganismos por tanto, tienen

que superar la repulsión electrostática para alcanzar la superficie del catalizador (Butterfield *et al.*, 1997). Rincón y Pulgarin (2004c) añaden a esta observación que la adsorción de las bacterias sobre el  $\text{TiO}_2$  puede modificarse en función de cambios en el pH del medio. Con pH superiores al punto de carga cero del  $\text{TiO}_2$  ( $\text{pH}=6,5$ ), la superficie se carga negativamente y con valores inferiores al punto de carga cero, positivamente. Las bacterias se cargan negativamente debido a grupos negativos como carboxilatos, polisacáridos y fosfonatos, que predominan en la pared celular y le confieren una carga negativa. Si bien también existen grupos cargados positivamente como amidas, proteínas y péptidos, cuya distribución sobre la superficie celular es irregular y por tanto, complica la interacción entre bacterias y el catalizador.

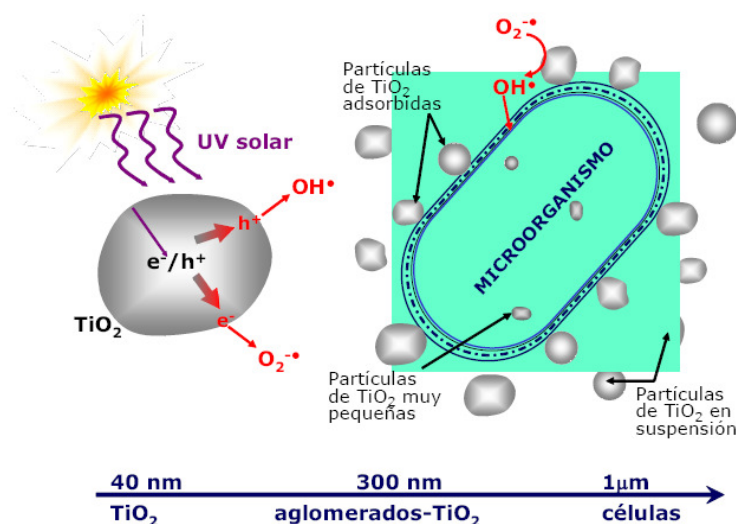
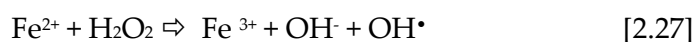


Figura 2.7. Mecanismo de ataque microbiano mediante el tratamiento de fotocatalisis (Fernández *et al.*, 2005).

Todas estas investigaciones tienen en común la idea de que debe existir un contacto directo entre el catalizador y el microorganismo, un fenómeno de adsorción, para producirse la oxidación directa de los componentes celulares (Huang *et al.*, 2000; Gogniat *et al.*, 2006).

Benabbou (2007) indica que la inactivación microbiana no sólo se debe a las especies activas generadas durante el proceso fotocatalítico sino que pueden generarse otros fenómenos, como la reacción foto-Fenton, que podría contribuir a la aceleración de la desinfección. De hecho, cuando la membrana es perforada, iones ferrosos y

férricos intracelulares pueden liberarse al medio y reaccionar para formar radicales hidroxilo, como establecen las ecuaciones 2.27 y 2.28.



Una de las causas que contribuyen a que no se conozca todavía de manera precisa cómo actúa la fotocatalisis sobre los microorganismos es la gran diversidad de condiciones experimentales que son investigadas, lo que complica la comparación de los diferentes estudios llevados a cabo en este campo. Hay muchas variables que afectan a la destrucción fotocatalítica de los patógenos como la concentración y el tipo de catalizador, la intensidad y rango de radiación, la concentración microbiana inicial (Rizzo, 2009), la temperatura, el pH (Rincón y Pulgarin, 2004c), el tipo de microorganismo, la presencia y el tipo de materia orgánica (Ireland et al., 1993; Rincón et al., 2001), la estructura y el tamaño de las partículas del catalizador y el reactor fotocatalítico (Rincón y Pulgarin, 2004a; Cushnie et al., 2009).

En la actualidad, se están diseñando plantas piloto con el objeto de que los tratamientos fotolíticos y fotocatalíticos puedan ser aplicados a escala real en un futuro cercano, bien como una etapa más dentro de las líneas de tratamiento de aguas o bien como etapa única (Malato et al., 2001; Fernández et al., 2005; Blanco et al., 2009; Chong et al., 2010). Además como el  $\text{TiO}_2$  se activa con el rango UV del espectro solar, este POA tiene mucho futuro en la potabilización de aguas en países tropicales en desarrollo con escasos recursos hídricos y una alta disponibilidad de irradiación solar (Malato et al., 2009).

Cualquiera que sea la localización de la etapa en la línea de tratamiento, la recuperación del catalizador es una consideración importante a tener en cuenta desde un punto de vista económico. Numerosas investigaciones en el ámbito de la desinfección han sido realizadas sobre poblaciones de *E. coli* con soportes inmovilizados de  $\text{TiO}_2$  o bien con  $\text{TiO}_2$  en suspensión, con buenos resultados en ambos casos, si bien la desinfección realizada con  $\text{TiO}_2$  en suspensión es superior por presentar una mayor área de superficie en contacto con los microorganismos (Fernández, 2003,



*Fernández et al.*, 2005; *Rincón y Pulgarin*, 2003, 2004a; *Gumy et al.*, 2006; *Alrousan et al.*, 2009).

#### 2.4.6. Fotocatálisis con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

En los tratamientos fotocatalíticos, además del dióxido de titanio y la radiación solar, pueden adicionarse otros oxidantes auxiliares, como el peróxido de hidrógeno o el peroxidisulfato sódico (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) para mejorar la eficacia del proceso (*Rincón et al.*, 2001, *Rincón y Pulgarin*, 2004c; *Kositzi et al.*, 2004). Si bien también hay trabajos en los que se pone de manifiesto que el uso adicional del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la fotocatalisis no mejora su eficacia (*Ljubas*, 2005).

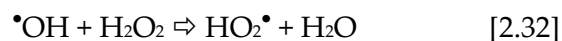
El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es una molécula de alto potencia redox (1,77V). Sus propiedades desinfectantes provienen de una acción directa molecular, pero en mayor medida de radicales libres formados en la catálisis (*Guittonneau et al.*, 1988).

Si se adiciona peróxido de hidrógeno al proceso fotocatalítico, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> participa junto con el oxígeno como aceptor de electrones en las reacciones redox que se producen sobre el catalizador [2.29], ayudando a evitar la recombinación de los pares electrón-hueco que pueden formarse en el proceso fotocatalítico, lo que conllevaría a unos resultados de desinfección inferiores [2.30] (*Hartmann e Eisenstark*, 1978).

El peróxido de hidrógeno también adsorbe directamente la radiación UV de la luz solar. Esta acción provoca una rotura de su enlace peroxídico, descomponiéndose en radicales OH y consecuentemente, incrementándose la destrucción de microorganismos presentes en el agua [2.31]. Este último mecanismo se ve favorecido en mayor grado con longitudes de onda en el rango 200-280 nm (*Mamane et al.*, 2007), si bien ha sido referenciado por el grupo de trabajo de Li (2003) la fotodescomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una suspensión de TiO<sub>2</sub> bajo radiación visible superior a 420 nm.

De manera negativa, si el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está en exceso, también puede participar como secuestrador de radicales OH o formar peroxocompuestos en la superficie del TiO<sub>2</sub>, perjudicando el proceso fotocatalítico, ya que estos últimos compuestos son menos reactivos [2.32] (*Kositzi et al.*, 2004).





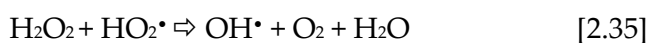
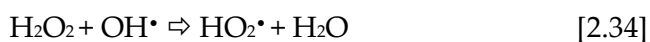
#### 2.4.6. Radiación solar con $\text{H}_2\text{O}_2$

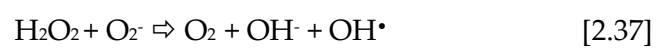
A pesar de que la mayoría de estudios sobre este POA se centran en la degradación de contaminantes químicos como pesticidas y fármacos (*Miguel, 2010*), existen también literatura sobre la combinación de radiación solar con peróxido de hidrógeno referente a la inactivación de microorganismos (*Rincón y Pulgarin, 2004c; Mamane et al., 2007*).

En este proceso tiene lugar dos mecanismos de acción; en primer lugar, una acción directa de la radiación solar sobre la membrana bacteriana de los microorganismos y en segundo lugar, un ataque oxidativo de la pared y membrana celulares por parte de radicales oxidativos generados, mayoritariamente radicales hidroxilo.

Como ya se indica en el apartado 2.4.5, los procesos de radiación solar con presencia de peróxido de hidrógeno son especialmente efectivos con longitudes de onda inferiores a 280 nm, ya que después de que la molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  absorbe la luz, se produce la ruptura de su enlace peroxídico, según la ecuación 2.33, generándose los radicales hidroxilo, que participarán de manera activa en el fenómeno de desinfección (*Mamane et al., 2007*). También está establecido que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede entrar en el interior de la célula y combinarse con iones de hierro intracelulares produciéndose una reacción Fenton (*Dunlop et al., 2008*).

A su vez, estos radicales hidroxilo pueden atacar al peróxido de hidrógeno, generándose una conjunto de reacciones secundarias en serie [2.34-2.36], entre la que destaca la combinación del peróxido de hidrógeno con el radical superóxido conocida como reacción Haber-Weiss, que aporta radicales hidroxilo adicionales [2.37] (*Dunlop et al., 2008*).





## Capítulo 3.

### Procedimientos analíticos y de tratamiento de datos

---



### 3.1. Parámetros de caracterización de TiO<sub>2</sub>

El TiO<sub>2</sub> utilizado en este trabajo de investigación se caracteriza mediante su superficie específica y su estructura.

#### 3.1.1. Superficie específica

La determinación del área superficial del catalizador se realiza con el método Brunauer-Emmet-Teller (BET).

El método BET se utiliza para determinar la superficie específica ( $S_e$ ) a partir de la medida de la adsorción de un gas a baja temperatura. Se usa un equipo de la marca Micromeritics Instruments Co., modelo Pulse Chemisorb 2700, con una unidad de control y medida de caudal másico para las corrientes de N<sub>2</sub> y He. Está provisto de una unidad adicional para la preparación de muestras (Desorb 2300 A) de la misma marca.

Para la determinación de la isoterma de adsorción de N<sub>2</sub> a 77 °K se emplea la técnica multipunto, determinando el volumen adsorbido en el intervalo de presiones parciales de adsorbato comprendidas entre el 5 y el 20 %. Para calcular el área BET, se toma un valor de 0,162 nm para la sección de la molécula de N<sub>2</sub> y una presión de saturación de éste de 775 mm Hg. Previamente, se realiza una limpieza de la superficie de las muestras para que toda su textura quede perfectamente accesible a las moléculas de N<sub>2</sub>. La isoterma BET se linealiza de acuerdo a la ecuación 3.1, donde  $P_s$  es la presión normal del adsorbato,  $V_{N_2}$  el volumen absorbido en condiciones normales de presión y temperatura,  $P_{s_0}$  la presión de saturación de N<sub>2</sub> a 77 °K,  $V_{N_2,m}$  el volumen de N<sub>2</sub> absorbido necesario para formar una monocapa en la superficie de la muestra,  $J$  la constante relacionada con la energía de adsorción y  $C_a$  una constante relacionada con la energía de adsorción del sólido.

$$\frac{P_s}{V_{N_2}(P_{s_0} - P_s)} = \frac{1}{V_{N_2,m} C_a} + \frac{J-1}{V_{N_2,m} C_a} \left( \frac{P_s}{P_{s_0}} \right) \quad [3.1]$$

La  $S_e$  del sólido (m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) se obtiene según la ecuación 3.2, donde  $V_m$  es el volumen de N<sub>2</sub> requerido para formar la monocapa,  $A$  el número de Avogadro,  $N_{N_2}$  la sección de la molécula de N<sub>2</sub> y  $M$  el volumen molar del gas.

$$S_e = \frac{V_m \cdot A \cdot N_{N2}}{M} \quad [3.2]$$

### 3.1.2. Caracterización estructural

Para determinar la estructura de las fases cristalinas del catalizador se utiliza la metodología de difracción de rayos X (DRX).

Los espectros de difracción se obtienen en un difractómetro de la marca Rygaku/Maz system, provisto de un ánodo rotatorio. Se utiliza un monocromador de grafito con el fin de seleccionar la radiación  $\text{CuK}\alpha$  del ánodo de cobre ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) y se trabaja con un ángulo de barrido ( $2\theta$ ) entre  $20$  y  $75^\circ$ , con un paso de  $0,03$  y tiempo de  $1 \text{ sg}$  por paso.

## 3.2. Parámetros de caracterización físico-química de aguas

### 3.2.1. Demanda de cloro

La demanda de cloro (CD) se define como la cantidad mínima de cloro que se necesita añadir a la muestra para satisfacer el consumo tras la desinfección y oxidación de los compuestos presentes. Para determinar este parámetro se utiliza el método estándar 5710 B (*Eaton et al.*, 2005).

El método consiste en adicionar un exceso de cloro ( $D_0$ ) a la muestra y analizar el cloro residual ( $R$ ) no consumido después de un mínimo de 4 horas, siendo la diferencia de ambos valores en  $\text{mg L}^{-1}$ , como indica la ecuación 3.3.

$$CD = D_0 - R \quad [3.3]$$

Para determinar  $D_0$  se añaden  $5 \text{ mL}$  de hipoclorito sódico comercial de  $50\,000 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$  diluido al  $10\%$  en un frasco con tapón de vidrio y se completa hasta rebose con agua destilada. Del contenido de este frasco se valoran  $100 \text{ mL}$  en un erlenmeyer con tiosulfato sódico  $0,025 \text{ N}$  ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  5-hidrato, Panreac), incluyendo en el contenido  $5 \text{ mL}$  de ácido acético ( $80\%$ , Panreac),  $1 \text{ g}$  de yoduro potásico (Carlo Erba) y  $2 \text{ mL}$  de almidón (Scharlau) como indicador hasta la desaparición del color. La dosis de cloro

exacta suministrada a la muestra se calcula según la ecuación 3.4, donde  $V_v$  es el volumen del agente valorante (tiosulfato sódico) consumido en la valoración,  $N$  es la normalidad del mismo (0,025 N) y  $V_m$  es el volumen de muestra valorado (100 mL).

$$D_0(\text{mgCl}_2\text{L}^{-1}) = V_v \cdot N \cdot 35,5 \cdot 1000 \cdot V_m^{-1} \quad [3.4]$$

De manera similar, para calcular R, en un frasco de las mismas características se añaden 5 mL de hipoclorito sódico comercial diluido al 10% y 5 mL de tampón fosfato I (68,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 11,7 g  $\text{NaOH}$  en 1L de agua destilada), completando el volumen con la muestra objeto de análisis. Se almacena durante mínimo 4 horas a temperatura ambiente en oscuridad con el tapón sellado herméticamente para evitar pérdidas de cloro por volatilidad. Trascurrido ese tiempo, en el cual el cloro reacciona con la materia orgánica presente en la muestra, se mide el cloro residual de la misma manera que para  $D_0$ .

### 3.2.2. Temperatura, pH, conductividad, turbidez, carbono orgánico total, absorbancia, $\text{Cl}_2$ libre, $\text{H}_2\text{O}_2$ y $\text{O}_3$ residual

La Tabla 3.1 muestra la metodología normalizada de análisis de los parámetros físico-químicos utilizados en la caracterización de las muestras analizadas durante los tratamientos estudiados, así como la instrumentación relacionada, el rango de medida y el error de dicha instrumentación.



Tabla 3.1. Instrumentación, metodología, rango de medida y error de cada uno de los instrumentos para la caracterización físico-química de las muestras.

Parámetro	Instrumento	Marca	Modelo	Rango medida	Error	Método Normalizado
<b>pH</b> <b>Temperatura</b>	pH-metro	Crison	GLP 21	2 a 16 -20 a 150 °C	$\leq 0,02$ $\leq 0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$	Método estándar <sup>1</sup> 4500- HB
<b>Conductividad</b>	Conductímetro	Crison	Basic 30	0,01 a 19.999 $\mu\text{S cm}^{-1}$	$\leq 0,5\text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$	Norma UNE 27888:1994
<b>Turbidez</b>	Turbidímetro	Hanna	LP 2000	00 a 50 NTU 50 a 1.000 NTU	0,2 NTU	Norma ISO 7027: 1999
<b>Carbono orgánico total</b>	Analizador de TOC	Shimadzu	TOC-Vcsh	TC:0 a 25.000 $\text{mg L}^{-1}$ IC: 0 a 30.000 $\text{mg L}^{-1}$	5-10 %	Método estándar <sup>1</sup> 5310 B
<b>Absorbancia</b>	Espectrofotómetro UV/Visible	Thermospectronic	Helios $\alpha$	-3 a 6 A	$\pm 0,005\text{ A}$	
<b>Cloro libre residual</b>	Medidor de cloro	Hanna Instruments	HI 95711	0,00 a 5,00 $\text{mg L}^{-1}$	$\leq 0,02\text{ mg L}^{-1}$	Método estándar <sup>1</sup> 4500-Cl G
<b>Peróxido de hidrógeno residual</b>	Test indicador de peróxidos (tiras reactivas)	Merck	Merckoquant®	0,5 a 25 $\text{mg L}^{-1}$		
<b>Ozono residual</b>	Test colorimétrico	Merck	Microquant®	0,05 a 4,00 $\text{mg L}^{-1}$	$\pm 0,1\text{ mg L}^{-1}$	

<sup>1</sup> Eaton et al., 2005

### 3.3. Parámetros de análisis microbiológicos

Los indicadores bacterianos de contaminación fecal objeto de estudio en el presente trabajo de investigación son *Clostridium perfringens* (células vegetativas y esporos) y *Enterococcus* sp.

#### 3.3.1. Análisis de *C. perfringens*

##### 3.3.1.1. Procedimiento normalizado

El cultivo y recuento de células vegetativas y esporos de *C. perfringens* se realiza siguiendo el procedimiento descrito en la Norma Española UNE-EN 26461-2: “Calidad del agua. Detección y recuento de los esporos de microorganismos anaerobios sulfito-reductores (clostridia). Parte 2: Método de filtración por membrana.” Esta norma UNE ha sido adoptada íntegramente de la Norma Internacional ISO 6461-2:1986.

##### 3.3.1.2. Medios de cultivo

Los productos químicos que se utilizan en la preparación de los medios de cultivo son de calidad analítica reconocida. El material de vidrio, antes de su uso, se esteriliza en el autoclave mediante calor húmedo durante 15 minutos a una temperatura de 121 °C para eliminar cualquier microorganismo o forma esporulada de resistencia y trabajar en condiciones estériles.

Los medios de cultivo son ambientes artificiales diseñados por el hombre para proporcionar todos los nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano en el laboratorio. En función del tipo de medio, se encuentran en estado líquido, sólido o semisólido. Los medios sólidos, que son los que se utilizan en esta investigación, se presentan de manera diversa, pero la forma más común es desecada en forma de polvo fino o granular. Para su reconstitución, se suspende la cantidad precisa de polvo en agua destilada y se lleva a ebullición. Posteriormente, se esteriliza durante 15 minutos a una temperatura de 121 °C en el autoclave. Tras finalizar el proceso de autoclavado, los frascos con el agar líquido se colocan en el baño termostático a 50 °C y se mantienen hasta su utilización. Si el medio de cultivo preparado no se utiliza inmediatamente, se guarda refrigerado y etiquetado durante un periodo no superior a un mes.

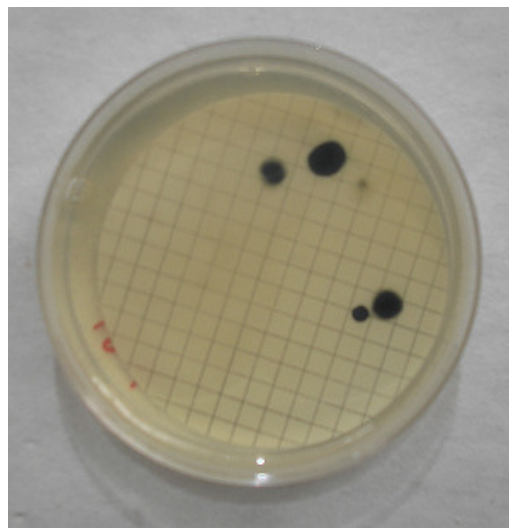
Para *C. perfringens* existen comercialmente una gran variedad de medios selectivos disponibles entre los que se encuentran el agar TSN (Tryptona Sulfito Neomicina), el agar SPS (Sulfito Polimixina Sulfadiazina), el agar TSC (Tryptosa Sulfito Cicloserina), el agar TSCF (es el agar TSC suplementado con Fluorocult), el agar SFP (Sahidi Ferguson Perfringens), el agar m-CP y el agar WB (Wilson Blair). Básicamente, los ingredientes son los mismos pero cada uno tiene sustancias selectivas diferentes que inhiben al resto de las bacterias y favorecen el crecimiento de *C. perfringens*.

El Real Decreto 140/2003 establece el agar m-CP como medio de cultivo de referencia para la recuperación de *C. perfringens* a partir de agua destinada a consumo humano. Los resultados de varios estudios llevados a cabo comparando los distintos medios de cultivo sugieren que el agar m-CP detecta niveles de *C. perfringens* comparables a los otros medios cuando la mayoría de los microorganismos son células vegetativas; sin embargo, funciona pobremente si las muestras de agua contienen predominantemente esporas (Araujo *et al.*, 2001, 2004).

En consecuencia, siguiendo criterios científicos, la facilidad de uso y un menor coste, se decide utilizar el medio SPS (Sharlau) (Araujo *et al.*, 2001, 2004). Este medio contiene como sustancias inhibidoras sulfito, polimixina y sulfadiazina. Al presentar sulfito en su composición (Tabla 3.2), cuando la bacteria crece lo utiliza reduciéndolo a sulfuro ferroso, proporcionando a sus colonias un color negro (Figura 3.1).

Tabla 3.2. Composición del agar SPS.

Ingredientes	Concentración (g L <sup>-1</sup> )
sulfito sódico	0,50
sulfato de polimixina(B)	0,01
sulfadiazina de sodio	0,12
peptona de caseína	15,00
extracto de levadura	10,00
citrato férrico	0,50
tioglicolato sódico	0,10
polisorbato 80	0,05
agar	15,00

Figura 3.1. Aspecto de colonias de *C. perfringens* en el agar SPS.

### 3.3.1.3. Equipos de laboratorio

Los equipos utilizados en el análisis microbiológico de *C. perfringens* se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Equipos de laboratorio utilizados en los análisis microbiológicos.

Instrumento	Marca	Modelo	Función
Estufas de cultivo	J.P. Selecta	INCUDIGIT 36 L	Cultivo bacteriológico.
Baño termostático	J.P. Selecta	PRECISTEM 20 L	Mantenimiento de ágar en estado líquido.
Autoclave	J.P. Selecta	437-P	Esterilización del material.
Microscopio óptico	Zeiss	Axiostar Plus	Pruebas de confirmación bacteriológicas.
Rampa de filtración	Millipore	Sistema Microfil	Análisis microbiológico.
Jarra de anaerobiosis	Oxoid	AG25	Cultivo de bacterias anaerobias.
Mechero bunsen			Crear condiciones de esterilidad.
Agitador Vortex	Velp Scientifica	ZX3	Mezcla de soluciones en tubos.

### 3.3.1.4. Diluciones decimales seriadas

El volumen de agua a filtrar depende de la concentración bacteriana de la muestra. El volumen recomendado por el RD 140/2003 es 100 mL, pero en aguas naturales sin tratar, el número de bacterias en este volumen puede variar desde pocas decenas hasta cientos de millares, lo que impediría en este último caso un recuento adecuado de las colonias. Por tanto, como no se conoce de antemano la concentración microbiológica presente en la muestra de agua a analizar, se realizan diluciones de la muestra inicial.

A partir del agua natural (dilución 0), se toma 1 mL de la muestra con micropipeta y se transfiere a un tubo con 9 mL de agua destilada al 0,9 % NaCl, estéril. A continuación, se homogeneiza en un vortex, obteniéndose de esta forma la dilución 1:10 (o dilución -1). Para hacer las diluciones sucesivas, se toma 1 mL de la dilución precedente bien homogeneizada y se lleva a un tubo con 9 mL de agua destilada al 0,9% NaCl, todo ello en ambiente de trabajo estéril, proporcionado con un mechero Bunsen. La Figura 3.2 refleja el procedimiento de diluciones decimales seriadas de manera gráfica y la Figura 3.3 el aspecto de las placas de Petri después de la siembra de dichas diluciones.

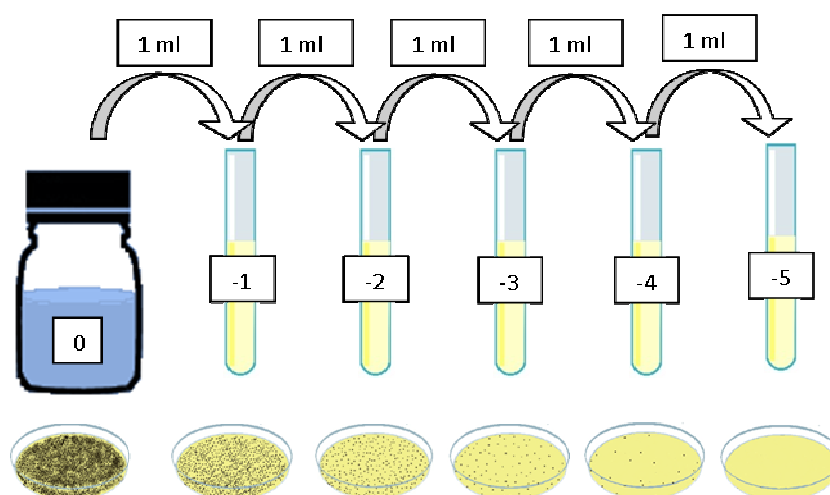


Figura 3.2. Esquema del método de diluciones seriadas.

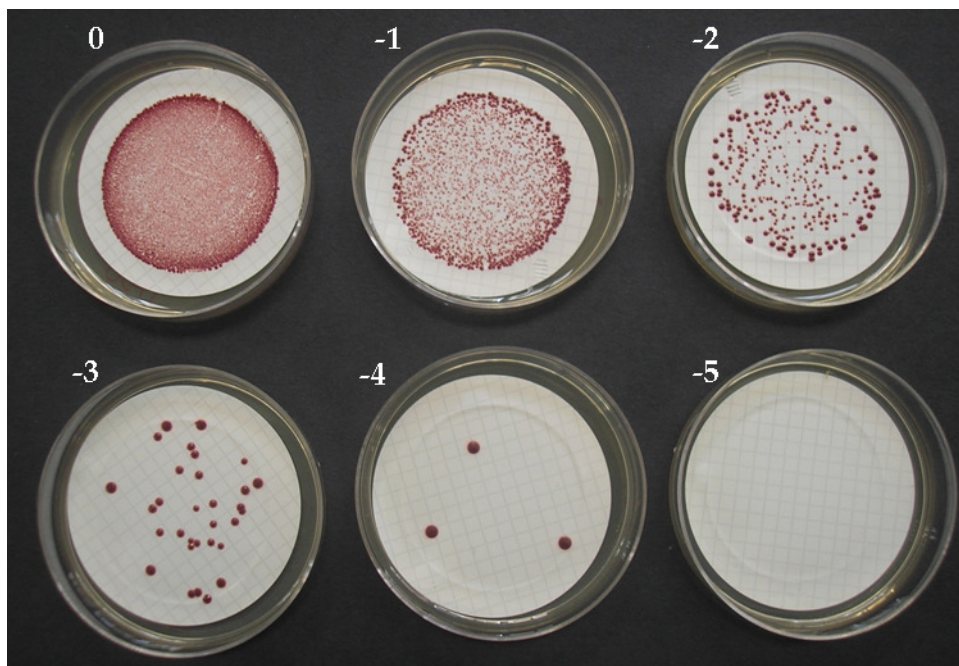


Figura 3.3. Aspecto de las placas de Petri después de la siembra de las diluciones decimales de una muestra de agua (de la más concentrada 0 a la más diluida -5).

#### 3.3.1.5. Método de filtración de membrana

La metodología más idónea para el aislamiento bacteriano en muestras de agua es la “filtración por membrana” por presentar una mayor reproducibilidad, rapidez y versatilidad en cuanto a volumen utilizado, respecto a la “técnica de tubos múltiples” (Eaton *et al.*, 2005).

En presencia de una atmósfera estéril proporcionada por un mechero Bunsen, mediante pinzas previamente flameadas, se coloca un filtro de membrana estéril (Millipore) de  $0,22\ \mu\text{m}$  de poro sobre el soporte de filtración (Figura 3.4.a y 3.4.b). Tras adaptar el embudo (Figura 3.4.c), se humedece el filtro con una pequeña cantidad de agua destilada al 0,9% NaCl estéril y se vierte la muestra, previamente homogeneizada (Figura 3.4.d). Las muestras comprendidas entre 30 y 100 mL se añaden directamente al embudo de filtración, pero para las muestras entre 1 y 30 mL, se añaden primero al embudo entre 20-30 mL de agua destilada y a continuación, la muestra a filtrar.

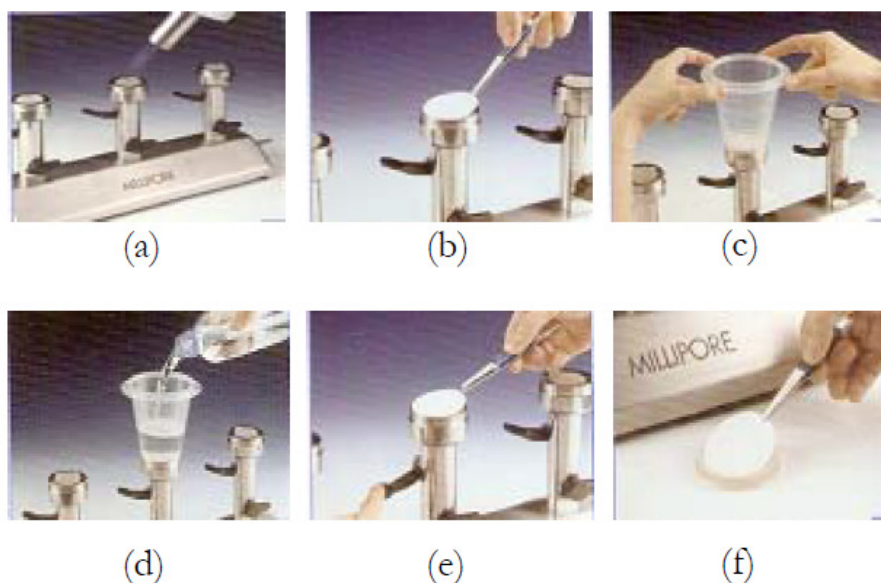


Figura 3.4. Método de filtración por membrana (Millipore).

Finalmente, se retira el embudo (Figura 3.4.e) y la membrana se transfiere al fondo de una placa de Petri pequeña (45 cm Ø) (Figura 3.4.f) para terminar vertiendo 8 mL de agar SPS licuado, mantenido hasta el momento a 50 °C en el baño termostático.

#### 3.3.1.6. Incubación

Tras solidificarse el agar, las placas se invierten e introducen en una jarra de anaerobiosis. Este recipiente permite conseguir una atmósfera sin oxígeno tras introducir una tableta de borhidruro sódico y otra de bicarbonato sódico y ácido cítrico que tras adición de 10 mL de agua estéril, genera la liberación de CO<sub>2</sub> e hidrógeno. Para confirmar la atmósfera anaerobia en el interior de la jarra, se coloca una tira indicadora que vira de color (de azul a blanco) en presencia de CO<sub>2</sub>.

La jarra debe permanecer en la estufa incubadora a 44 °C durante 24 horas. Se cuentan todas las colonias ennegrecidas que aparecen después del periodo de incubación (Figura 3.1).

#### 3.3.1.7. Recuento e inactivación

El recuento en placa se basa en la suposición de que cada bacteria crece y se divide para producir una sola colonia. Esto no siempre es cierto porque las bacterias con frecuencia crecen unidas en cadena o agrupadas. Por consiguiente, a menudo una colonia no se produce como resultado de una única bacteria. Para reflejar esta realidad

los recuentos en placa se indican como unidades formadoras de colonias (UFC) (*Tortora et al., 2007*). Los datos de cada experimento realizado se expresan en UFC·100 mL<sup>-1</sup>.

Es importante que el número de colonias que aparecen en las placas no sea demasiado grande, pues algunas colonias se pueden fusionar dando estimaciones erróneas. También se debe evitar que el número de colonias sea demasiado bajo para que el cálculo sea estadísticamente significativo. Cuando no se detecta ningún microorganismo en la placa sembrada, el valor que se toma es 1 UFC·100 mL<sup>-1</sup> para permitir el cálculo posterior con logaritmos (*Madigan et al., 2003*). Para obtener el número apropiado de colonias se diluye la muestra, tal y como se explica en el apartado 3.3.1.4.

Tras seleccionar las placas con crecimiento adecuado, el recuento bacteriano se obtiene aplicando la ecuación 3.5, donde  $F_d$  es el factor de dilución, es decir, la inversa de la dilución seleccionada.

$$\frac{\text{UFC}}{100 \text{ mL}} = \frac{\text{UFC}}{\text{mL muestra filtrado}} \cdot 100 \text{ mL} \cdot F_d \quad [3.5]$$

Para calcular la inactivación bacteriana y por tanto, evaluar la eficacia de un tratamiento en la desinfección de una muestra, se utilizan unidades logarítmicas. Para ello se utiliza la expresión 3.6, donde  $N_0$  es la población inicial bacteriana y  $N_t$  la población que sobrevive en un determinado tiempo  $t$ , ambos parámetros medidos en UFC·100 mL<sup>-1</sup>.

$$\text{Inactivación bacteriana} = \text{Log}_{10} \left( \frac{N_t}{N_0} \right) \quad [3.6]$$

#### 3.3.1.8. Caracterización bacteriana por la tinción de Gram

Tras realizar el recuento bacteriano de *C. perfringens* en los experimentos realizados, se lleva a cabo una tinción Gram de algunas de las colonias obtenidas, de manera aleatoria y de alguna en particular si el tipo de colonia es aparentemente distinta.

Esta técnica no sólo permite establecer si una bacteria es Grampositiva o Gramnegativa, sino que también permite visualizar la morfología de la bacteria y por



lo tanto, valorar si coexisten una especie o varias en el cultivo bacteriano o de otra manera, si el cultivo es puro o no.

El procedimiento completo de la tinción de Gram se detalla en la Figura 3.5, así como los cambios de color producidos en las bacterias Grampositivas y Gramnegativas a lo largo del procedimiento.

Previamente a la tinción, se realiza un frotis de la colonia que se quiere estudiar en un portaobjetos. Cuando la muestra está seca, se procede a la tinción. Las bacterias se someten a la acción de tres colorantes y un decolorante.

El primer colorante es el cristal violeta, el cual imparte su color morado a todas las células. Tras 1 minuto de contacto, se lava el porta con agua destilada y se añade el segundo colorante, el lugol. Tras otro minuto de contacto, se lava nuevamente la muestra y se aplica el decolorante, que es alcohol-acetona. Los organismos Grampositivos no se decoloran debido al grosor de su pared, reteniendo por tanto el primer colorante azulado; mientras que la capa de peptidoglicano de las Gramnegativas es demasiado delgada para retener el color formado previamente y se mantienen incoloras ( consultar estructura de la membrana, Figura 2.1).

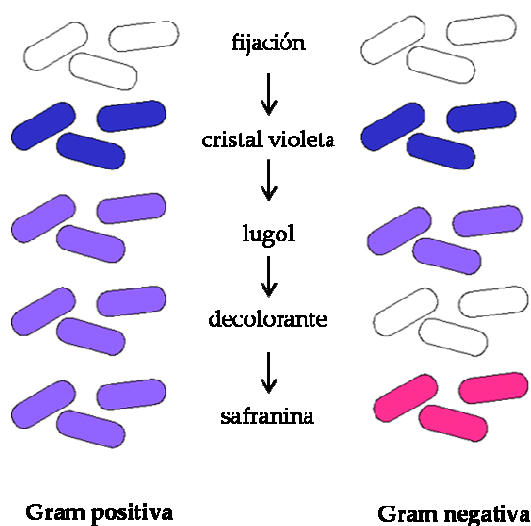


Figura 3.5. Técnica de coloración de Gram.

Para poner de manifiesto las células Gramnegativas se utiliza un último color de contraste, la safranina o fucsina básica, durante un periodo de 40 segundos. Tras la

coloración de contraste, las células Gramnegativas aparecen rojas, mientras que las Grampositivas permanecen de un color morado azulado.

*C. perfringens*, bacteria Grampositiva, presenta una coloración azulada.

### 3.3.1.9. Repetibilidad del método de análisis de *C. perfringens*

Para validar el método de análisis de filtración de membrana utilizado para determinar la supervivencia de las poblaciones de *C. perfringens* en los tratamientos estudiados, se determina el coeficiente de variación.

El coeficiente de variación (CV) representa la reproducibilidad del método, es decir, el grado de concordancia entre diferentes medidas realizadas en las mismas condiciones. Se expresa en porcentaje mediante la ecuación 3.7, siendo  $\bar{X}$  el recuento medio de las colonias en las placas recontadas, calculado por la ecuación 3.8 y S la desviación estándar de las muestras, una medida de la dispersión de los datos, expresada según la ecuación 3.9, donde  $N_r$  es el número de réplicas de un ensayo y  $X_i$  el valor de una réplica determinada (D'Ocon, 2002, Ibarz, 2008).

$$CV(\%) = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100 \quad [3.7]$$

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^N X_i}{N_r} \quad [3.8]$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_r} (X_i - \bar{X})^2}{N_r - 1}} \quad [3.9]$$

Para obtener la desviación estándar de las muestras y el valor medio del recuento de las placas, se analizan ocho réplicas mediante la filtración de una muestra directa de agua (volúmenes 10, 5 y 1 mL) y de dos diluciones (1/10 y 1/100) de la misma muestra. Se filtran varios volúmenes de muestra con la finalidad de obtener un número adecuado de colonias por placa. Se seleccionan las placas que albergan un intervalo de colonias entre 15 y 150. Por debajo de ese límite inferior, el error es

elevado y hay peligro de dar resultados ajenos a la realidad. Por encima del límite superior, las colonias presentan problemas de fusión.

El recuento de *C. perfringens* se realiza mediante la ecuación 3.5 y el resultado se transforma en unidades logarítmicas. Según bibliografía consultada, los valores  $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  se distribuyen dando curvas asimétricas (*Eaton et al., 2005*). Sin embargo, si esos valores se transforman en logaritmos, los nuevos valores se aproximan a una distribución simétrica, normal. Como los resultados de inactivación se expresan en unidades logarítmicas, tal y como se explica en el apartado 3.3.1.7 del presente capítulo, el CV también se calcula en esas mismas unidades.

La Tabla 3.4 refleja los resultados obtenidos. Los volúmenes de 10 y 5 mL de la dilución 0 y el volumen 1 mL de la dilución 1/10 contienen recuentos en el intervalo de trabajo fijado. Los recuentos obtenidos tras filtrar 1 mL de la dilución 0 y de la dilución 1/100 no se muestran porque están fuera del rango de trabajo establecido ( $<15 \text{ UFC}$ ). El CV calculado para los tres volúmenes seleccionados es de 3,7, 4,0 y 2,2 % respectivamente. En consecuencia, se establece como CV para el método de filtración de membrana sobre *C. perfringens* el intervalo 2,2-4,0 %.

Tabla 3.4. Coeficiente de variación del método de filtración de membrana sobre *C. perfringens* para varios volúmenes de muestra.

Muestra	Dilución 0 10 mL		Dilución 0 5 mL		Dilución 1/10 1 mL	
	UFC · 100mL <sup>-1</sup>	Log	UFC · 100mL <sup>-1</sup>	Log	UFC · 100mL <sup>-1</sup>	Log
1	5,1 · 10 <sup>2</sup>	2,7	3,8 · 10 <sup>2</sup>	2,6	4,7 · 10 <sup>2</sup>	2,7
2	5,2 · 10 <sup>2</sup>	2,7	3,8 · 10 <sup>2</sup>	2,6	3,7 · 10 <sup>2</sup>	2,6
3	4,4 · 10 <sup>2</sup>	2,6	4,4 · 10 <sup>2</sup>	2,6	3,7 · 10 <sup>2</sup>	2,6
4	4,3 · 10 <sup>2</sup>	2,6	5,2 · 10 <sup>2</sup>	2,7	4,0 · 10 <sup>2</sup>	2,6
5	6,0 · 10 <sup>2</sup>	2,8	5,2 · 10 <sup>2</sup>	2,7	5,0 · 10 <sup>2</sup>	2,7
6	5,1 · 10 <sup>2</sup>	2,7	6,4 · 10 <sup>2</sup>	2,8	4,8 · 10 <sup>2</sup>	2,7
7	5,1 · 10 <sup>2</sup>	2,7	7,4 · 10 <sup>2</sup>	2,9	3,7 · 10 <sup>2</sup>	2,6
8	3,5 · 10 <sup>2</sup>	2,5	6,4 · 10 <sup>2</sup>	2,8	3,7 · 10 <sup>2</sup>	2,6
X		2,7		2,7		2,6
S		0,1		0,1		0,1
CV (%)		2,65		4,0		2,2

### 3.3.2. Análisis de *Enterococcus* sp.

#### 3.3.2.1. Procedimiento normalizado

El cultivo y recuento de *Enterococcus* sp. se realiza siguiendo el procedimiento descrito en la Norma Española UNE-EN ISO 7899-2:2001: “Detección y recuento de enterococos intestinales. Parte 2: Método de filtración por membrana.” Esta norma UNE ha sido adoptada íntegramente de la Norma Internacional ISO 7899-2:2000.

#### 3.3.2.2. Medios de cultivo

El medio utilizado para el cultivo de *Enterococcus* sp. es el agar selectivo Slanetz & Bartley (Scharlau) (Tabla 3.5). La preparación de este agar conlleva después de su esterilización y enfriamiento a 50 °C, la adición de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) en una proporción de 10 mL por cada litro de medio base. La solución TTC se utiliza como indicador de color. Esta solución indica la actividad biológica de los enterococos, ya que el cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (incoloro) se reduce a trifenílformazán (rojo), de manera que las colonias adquieren un color granate característico (Figura 3.6).

Tabla 3.5. Composición del agar SB.

Ingredientes	Concentración (g L <sup>-1</sup> )
Triptosa	20,0
Extracto de levadura	5,0
Glucosa	2,0
Hidrogenofosfato de dipotasio	4,0
Azida de sodio (NaN <sub>3</sub> )	0,4
cloruro de trifeníltetrazolio	0,1
Agar	10



Figura 3.6. Aspecto de colonias de *Enterococcus* sp. en el agar SB.

#### 3.3.2.3. Equipos de laboratorio

Los equipos utilizados en el análisis microbiológico de *Enterococcus* sp. se recogen en la Tabla 3.3 del presente capítulo.

#### 3.3.2.4. Diluciones decimales seriadas

Con la finalidad de filtrar un volumen de muestra que permita un recuento adecuado de colonias de *Enterococcus* sp., se realizan diluciones decimales seriadas. Esta metodología de trabajo es la misma que la utilizada en el caso de *C. perfringens* y se explica con detalle en el apartado 3.3.1.4 del presente capítulo.

#### 3.3.2.5. Método de filtración de membrana

El método de filtración de membrana es también el método seleccionado para aislar de manera adecuada *Enterococcus* sp. de las muestras de agua, cuyos pasos a seguir se detallan en el apartado 3.3.1.5 del presente capítulo.

Las únicas diferencias con el procedimiento utilizado en la detección de *C. perfringens* se traducen en la utilización de membranas con mayor tamaño de poro (0,45 µm) y en la colocación del filtro de membrana una vez filtrada la muestra, que se coloca directamente sobre el agar SB ya solidificado en la placa de Petri, cuidando que no quede ninguna burbuja debajo del filtro.

#### 3.3.2.6. Incubación

Las placas con los filtros se invierten e introducen en la estufa incubadora a 37 °C durante 48 horas. Tras finalizar el periodo de incubación, se cuentan todas las colonias que presentan una coloración roja, marrón o rosa, bien en su centro o en su periferia después del periodo de incubación (Figura 3.6).

#### 3.3.2.7. Recuento e inactivación

El recuento de colonias de *Enterococcus* sp. y el cálculo del grado de inactivación alcanzado por los distintos tratamientos evaluados se desarrollan en el apartado 3.3.1.7 del presente capítulo, siendo los mismos que los utilizados sobre *C. perfringens*.

#### 3.3.2.8. Caracterización bacteriana por la tinción de Gram

La técnica es la misma que emplea en el caso de *C. perfringens* y se describe detalladamente en el apartado 3.3.1.8 del presente capítulo.

*Enterococcus* sp. al ser una bacteria Grampositiva, se visualiza de color azulado.

### 3.3.2.9. Repetibilidad del método de análisis de *Enterococcus* sp.

Ibarz (2008) calculó el coeficiente de variación del método de filtración de membrana sobre *Enterococcus* sp., estableciendo un CV entre el 3-10 %.

## 3.4. Tratamiento de datos

### 3.4.1. Estudio de las variables influyentes en los tratamientos de desinfección

El Diseño de Experimentos es el proceso de planificación de experimentos que conduce a la obtención de resultados que serán interpretados en una etapa posterior de análisis estadístico con objeto de producir conclusiones válidas y objetivas.

En primer lugar es necesario decidir el tipo de diseño más adecuado. Los diseños factoriales son ampliamente utilizados en la experimentación en la que intervienen varias variables, con el fin de estudiar su efecto conjunto sobre un factor respuesta, que en este estudio es la *inactivación logarítmica* de las poblaciones bacterianas. El diseño seleccionado en esta investigación es el conocido como diseño  $2^k$ , en el que se tienen k variables, cada una con dos niveles.

El diseño se realiza por duplicado y tanto para diseñar los experimentos como para el análisis de resultados, se utiliza el programa informático Minitab®, en su versión para Windows. Este programa es un software estadístico que permite tanto el diseño de experimentos como la obtención de gráficos y parámetros estadísticos, la obtención de modelos reducidos y en general, las herramientas necesarias para cualquier tratamiento de datos.

Tras seleccionar las variables y sus correspondientes niveles, el programa construye la matriz de diseño para la planificación de los experimentos y su realización. Para obtener conclusiones estadísticas se establece un intervalo de confianza que expresa la probabilidad de que las conclusiones que se obtienen son ciertas. En este estudio se fija un intervalo del 95 %.

Minitab® genera tres tipos de representaciones a partir del análisis de los resultados obtenidos:

*Gráfica del efecto de cada variable sobre el factor respuesta:* se estima el efecto de cada variable sobre el factor respuesta y se representa la media de la inactivación obtenida para cada variable y para cada uno de los dos niveles seleccionados. La pendiente de la

recta obtenida para cada variable es indicativa de la influencia de dicha variable sobre el factor respuesta. A mayor pendiente, la influencia sobre el factor respuesta es más importante.

*Gráfica de las interacciones entre variables:* esta representación permite apreciar la existencia o no de interacción entre las variables seleccionadas. Cuando en esta gráfica las líneas son paralelas o casi paralelas, la interacción entre esos dos factores es poco significativa. Si por el contrario, las líneas se cortan o tienden a cortarse, indican la existencia de una interacción entre las variables.

*Diagrama de Pareto:* representa las variables e interacciones más importantes en el proceso a nivel estadístico sobre el factor respuesta, representando gráficamente las estimaciones de cada efecto en orden decreciente. Los efectos significativos son aquellos que en el diagrama sobrepasan la línea roja discontinua, la cual se calcula mediante el margen de error simultáneo.

### 3.4.2. Tratamiento estadístico de comparación de resultados

Los experimentos realizados en esta investigación se llevan a cabo por triplicado, a excepción de los realizados con las técnicas de desinfección de ozono, que al depender de la concentración de ozono consumida por la muestra y por tanto variar entre los diferentes tratamientos, no han podido contar con réplicas.

Los resultados se expresan a partir de la media (ecuación 3.8), más menos su desviación estándar (ecuación 3.9), representándose esta desviación en las gráficas como barras de error.

A partir de los resultados microbiológicos derivados de los tratamientos de desinfección aplicados, se realiza un análisis estadístico mediante el programa GraphPad Prism® (version 4.03). Se aplica un análisis ANOVA de una vía usando el test Bonferroni con el objetivo de determinar si existen o no diferencias significativas entre las diversas condiciones de estudio aplicadas.

En todos los casos se utiliza un nivel de confianza del 95%, que se corresponde con un valor de significación de 0,05. El test de Bonferroni da como resultado un valor  $p$ , de manera que cuando ese valor es mayor que el nivel de significación ( $p > 0,05$ ), la diferencia entre los tratamientos comparados no se considera significativa y si  $p$  es menor que el nivel de significación, entonces la diferencia entre los tratamientos se

considera significativa ( $p < 0,05$ ), muy significativa ( $p < 0,01$ ) o altamente significativa ( $p < 0,001$ ) (Lamotte, 1981).

### 3.4.3. Modelos cinéticos de inactivación microbiana

#### 3.4.3.1. Descripción de modelos

La microbiología predictiva es una parte esencial de la microbiología que pretende conocer la respuesta de las poblaciones microbianas frente a diversas condiciones ambientales o tratamientos. Combina conocimientos de diferentes disciplinas (matemáticas, microbiología, ingeniería y química) con el objetivo común de desarrollar modelos matemáticos que describan y permitan predecir el ritmo de inactivación de los microorganismos de una determinada población, sometidos a condiciones tecnológicas o medioambientales determinadas (Gómez, 2005).

Dentro de los tipos modelos matemáticos existentes, este estudio de investigación se centra en los modelos de inactivación, modelos que estudian el ritmo de mortandad de las poblaciones bacterianas a lo largo de un proceso. La inactivación bacteriana en aguas ha sido bastante estudiada en la última década aplicando una gran variedad de modelos cinéticos de desinfección. La modelización cinética nace con la finalidad de simplificar e idealizar fenómenos complejos (Lee y Nam, 2002). Con ella se consigue obtener una expresión matemática que facilite el diseño adecuado de un sistema de desinfección.

Durante la mayor parte del siglo XX, en los sistemas de desinfección, era práctica habitual el empleo de un exceso de desinfectante para cumplir así con los requisitos exigidos de calidad del agua. Sin embargo, en la actualidad, se considera que el diseño óptimo y el funcionamiento correcto de un sistema de desinfección exigen el desarrollo previo de modelos cinéticos que puedan ser fácilmente incorporados a las distintas configuraciones de los reactores que se emplean en el campo del tratamiento de aguas.

Los modelos cinéticos desarrollados en la literatura tratan de representar la acción de un desinfectante y su particular modo de actuación sobre los microorganismos presentes en el agua, bajo las condiciones particulares del sistema que se estudia.



Chick (1908) formula la primera cinética de inactivación de primer orden para la modelización de las gráficas de inactivación lineales. Con ella intenta explicar el proceso de desinfección como si de una reacción química se tratara. Considera que este proceso es análogo a una reacción química de primer orden en la que la velocidad de la reacción depende de las concentraciones relativas del desinfectante y los microorganismos, estando el desinfectante en exceso. Este modelo se expresa mediante la ecuación 3.10 donde  $N_t$  es el número de bacterias supervivientes en el instante  $t$ ,  $N_0$  es el número de bacterias inicial ( $t=0$ ) y  $k$  es la constante de velocidad de la reacción.

$$\frac{dN}{dt} = -k \cdot N \quad \Rightarrow \quad \ln \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot t \quad [3.10]$$

En el mismo año Watson (1908) incluye una modificación al modelo de Chick, incorporando el efecto de la concentración del desinfectante en el proceso de desinfección. El modelo de Chick-Watson se representa por la ecuación 3.11, donde  $C$  es la concentración del desinfectante y  $n$  es el número de moléculas de desinfectante necesarias para la inactivación microbiana o también descrito como coeficiente de dilución, un factor empírico que suele considerarse la unidad (Pernitsky *et al.*, 1995; Li, 2004).

$$\frac{dN}{dt} = -k \cdot C^n \cdot N \quad \Rightarrow \quad \ln \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot C^n \cdot t \quad [3.11]$$

Estas cinéticas sencillas asumen que todos los microorganismos de la población presentan la misma sensibilidad al agente letal por lo que, cuando se representa su inactivación frente al tiempo de tratamiento, bajo una intensidad constante, se obtiene una línea recta.

Sin embargo, estos modelos lineales no permiten explicar desviaciones observadas en muchos procesos de inactivación microbiana, como se refleja en la Figura 3.7. La curva de inactivación A representa la cinética de primer orden o muerte exponencial, en la que la velocidad de inactivación es constante e independiente del tiempo de tratamiento. La curva B muestra un hombro inicial (shoulder) o fase “lag” en

la que una fracción de microorganismos supervivientes se mantiene constante en los primeros instantes del tratamiento, produciéndose seguidamente un descenso lineal de los mismos. Se atribuye a una mezcla inadecuada del desinfectante en la muestra, un retraso en la difusión del desinfectante a los puntos de acción bacterianos o a una resistencia inicial de los microorganismos al ataque del desinfectante. Las curvas C se caracterizan por una fase de inactivación lineal inicial rápida seguida de una disminución de las poblaciones lenta, lo que se traduce en la formación de una cola o tailing-off (*Gyürék y Finch, 1998*). Al igual que en el fenómeno de los hombros, existen varias teorías acerca de la aparición de colas. Puede ser debido a agrupaciones de microorganismos, a la presencia de subpoblaciones con una resistencia variable al desinfectante, bien de carácter innato o como respuesta a una adaptación al medio, o también, a que se produzca una disminución en la concentración del desinfectante durante el tratamiento. Finalmente, las curvas D presentan ambas desviaciones lineales, mostrando una fase inicial de hombro seguida de una fase lineal de inactivación y finalizando con un fenómeno de cola (curvas sigmoideas).

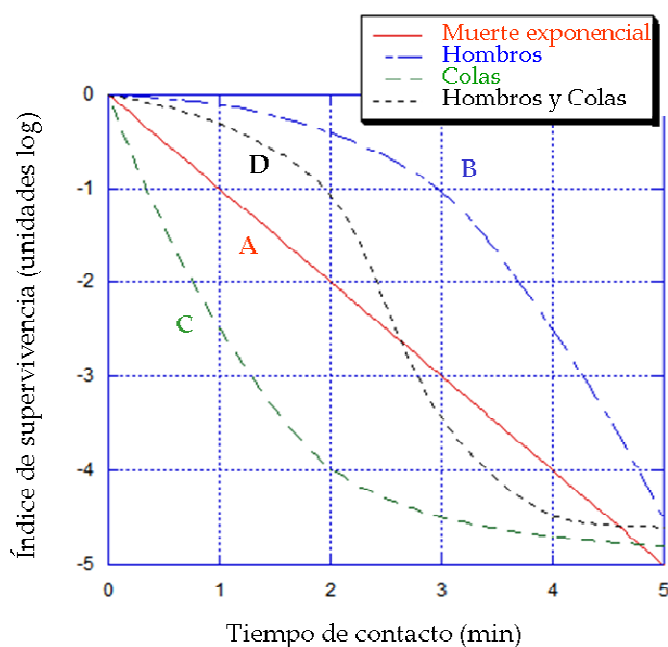


Figura 3.7. Curvas de supervivencia microbiana posibles (Fuente: *Gyürék and Finch, 1998*).

A partir de estas teorías se desarrollan cinéticas alternativas que permiten describir curvas de supervivencia no lineales y que han sido aplicados por numerosos

autores para describir el comportamiento de diversos microorganismos en el campo de la desinfección (Cho et al., 2003; Boyle et al., 2008; Gomes et al., 2009; Azzellino et al., 2011).

La Tabla 3.6 recoge los modelos matemáticos propuestos para describir las gráficas de inactivación obtenidas en el presente trabajo de investigación. La selección de estos modelos se realiza en base al principio de parsimonia según el cual los modelos han de ser tan simples como sea posible, es decir, con el menor número de parámetros posible (Gómez, 2005). La bondad del ajuste puede mejorar en gran medida añadiendo más parámetros al modelo; sin embargo, en ocasiones, aumentar mucho el número de parámetros puede llevar a que las predicciones no tengan sentido.

Tabla 3.6. Modelos cinéticos de estudio aplicados.

Modelo cinético	Ecuación integrada	Coefficientes cinéticos	Referencias
Modelo de Hom	$\text{Log} \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot C^n \cdot t^m = -K \cdot t^m$	K, n, m	Hom, 1972
Modelo de Hom modificado	$\text{Ln} \frac{N_t}{N_0} = -\left(\frac{m}{nk'}\right)^m k \cdot C_0^n \left[1 - \exp\left(\frac{-nk't}{m}\right)\right]^m$	k, k', n, m	Haas y Joffe, 1994
Modelo bifásico	$\text{Log} \frac{N_t}{N_0} = \text{Log} \left[ P \cdot e^{-k_1 \cdot t} + (1 - P) e^{-k_2 \cdot t} \right]$	P, k <sub>1</sub> , k <sub>2</sub>	Pruitt y Kamau, 1993
Modelo de Mafart	$\text{Log} \frac{N_t}{N_0} = -\left(\frac{t}{\delta}\right)^p$	δ, p	Mafart et al., 2002
Modelo de Geeraerd	$N_t = (N_0 - N_{res}) e^{-k_{max} t} \cdot \left( \frac{e^{k_{max} \cdot S_1}}{1 + (e^{k_{max} \cdot S_1} - 1) e^{-k_{max} t}} \right) + N_{res}$	k <sub>máx</sub> , S <sub>1</sub>	Geeraerd et al., 2000

A continuación se desarrollan con más detalle cada uno de los modelos matemáticos seleccionados:

**Modelo de Hom (1972)**

Hom, tras analizar los resultados de diversos experimentos de cloración sobre sistemas algales-bacterianos y observar que respondían a cinéticas curvilíneas más que a lineales, generalizó de manera empírica la ley de Chick-Watson mediante la ecuación 3.12, donde  $k$  es la constante de velocidad de inactivación de primer orden,  $C$  es la concentración del desinfectante,  $n$  el coeficiente de dilución y  $m$  una constante empírica del modelo (Li, 2004; Méndez *et al.*, 2008). En el caso de que la concentración sea constante, el modelo se simplifica integrándose esta concentración en una constante de velocidad aparente ( $k_{ap} = k \cdot C^n$ ) dando lugar a la ecuación 3.13, siendo esta  $k_{ap}$  una constante de pseudo-primer orden ( $\text{min}^{-1}$ ) (Malato *et al.*, 2009).

Este modelo no considera que el agua tenga una demanda de desinfectante y por tanto, que la concentración del mismo disminuya a lo largo del tratamiento (Haas y Joffe, 1994).

$$\frac{dN}{dt} = -k \cdot m \cdot C^n \cdot N \cdot t^{m-1} \quad \Leftrightarrow \quad \text{Log} \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot C^n \cdot t^m \quad [3.12]$$

$$\text{Log} \frac{N_t}{N_0} = -k_{ap} \cdot t^m \quad [3.13]$$

El nivel de inactivación predicho por el modelo de Hom es una función no lineal de  $C$  y  $t$ , que dependen de los parámetros del modelo  $n$  y  $m$ , respectivamente. Este modelo puede describir las curvas A-D de la Figura 3.7 y se simplifica al modelo Chick-Watson para  $n=1$  y  $m=1$ . Cuando  $m$  es menor que la unidad, se visualiza un efecto de cola o tailing-off.

**Modelo de Hom modificado (1994)**

Años más tarde, Haas y Joffe en 1994 modifican el modelo de Hom estableciendo que la concentración del desinfectante puede cambiar con el tiempo, debido a la demanda de los microorganismos o de otros componentes presentes en el agua. Si la descomposición del desinfectante residual es de primer orden, como frecuentemente se observa para la descomposición del cloro y ozono, se establece una relación entre la concentración residual y el tiempo según la ecuación 3.14 donde  $C_0$  es

la concentración inicial y  $k'$  la constante de velocidad de descomposición del desinfectante ( $\text{min}^{-1}$ ).

$$C = C_0 \cdot \exp(-k't) \quad [3.14]$$

A partir de las ecuaciones 3.12 y 3.14, se obtiene el modelo de Hom modificado, ecuación 3.15. Este modelo añade una constante al modelo de Hom,  $k'$ , considerando la demanda del desinfectante por parte de la muestra. Ha sido utilizado en diversos estudios de ozono (*Cho et al., 2003*).

$$\text{Log} \frac{N_t}{N_0} = -\left(\frac{m}{nk'}\right)^m k \cdot C_0^n \left[1 - \exp\left(\frac{-nk't}{m}\right)\right]^m \quad [3.15]$$

#### **Modelo bifásico de Pruitt y Kamau (1993)**

En 1993, Pruitt y Kamau establecen un modelo bifásico basado en la existencia de dos poblaciones microbianas que presentan una sensibilidad al tratamiento diferente, siguiendo en ambos casos una cinética de inactivación de primer orden. La expresión matemática del modelo se define por la ecuación 3.16, donde P significa la fracción de microorganismos supervivientes correspondientes a la subpoblación 1, (1-P) es la fracción de supervivientes de la subpoblación 2,  $k_1$  representa la constante de inactivación de la población sensible y  $k_2$  es la constante de inactivación de la población resistente.

$$\text{Log} \frac{N_t}{N_0} = \text{Log} \left[ P \cdot e^{-k_1 t} + (1 - P) \cdot e^{-k_2 t} \right] \quad [3.16]$$

#### **Modelo de Mafart (2002)**

Peleg y Cole (1998) proponen el uso de distribuciones estadísticas tipo Weibull para desarrollar modelos que incluyan tanto cinéticas convexas, con un periodo inicial sin aparente inactivación, como cóncavas en las que no se consigue una inactivación completa. La distribución de Weibull es una distribución de probabilidades diseñada para describir el comportamiento de sistemas que tienen cierto grado de variabilidad.

El modelo asume que la inactivación microbiana se debe a la incapacidad de la célula para resistir las duras condiciones impuestas por algún tipo de estrés, después de cierto tiempo; también asume que la población es heterogénea, es decir, que cada célula tarda un tiempo diferente en morir. En definitiva, es un modelo que implica la existencia de una distribución de resistencias dentro de la población microbiana. La resistencia sigue una distribución de probabilidad de Weibull, definida por la ecuación 3.17.

Mafart (2002) modifica la ecuación Weibull según la ecuación 3.18, donde  $\delta$  es el parámetro de escala y se corresponde con el tiempo necesario para reducir el primer ciclo logarítmico decimal de la población bacteriana y  $p$  es el parámetro de forma e indica la forma de la curva de la ecuación, ya que ésta toma formas convexas cuando  $n$  es mayor que 1 y cóncavas cuando es menor que 1.

Este modelo se fundamenta en modelos de inactivación termal, ya utilizado para describir perfiles de desinfección sobre diferentes tipos de microorganismos, fotorreactores y parámetros operacionales en fotocátalisis (Boyle *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2009).

$$f(t) = \frac{n}{b} \left( \frac{t}{b} \right)^{n-1} e^{-\left( \frac{t}{b} \right)^n} \quad [3.17]$$

$$\text{Log} \frac{N_t}{N_0} = -\left( \frac{t}{\delta} \right)^p \quad [3.18]$$

### Modelo de Geeraerd (2000)

Este modelo matemático se basa en diversos argumentos que describen el comportamiento de los microorganismos cuando se presentan fenómenos de hombro, una fase de inactivación lineal y cola, es decir, cuando describen curvas sigmoideas (Cerf, 1977; Casolari, 1988; Geeraerd *et al.*, 2000). La incorporación de cada fenómeno se engloba en la ecuación 3.19, donde  $N_{res}$  es la concentración de bacterias supervivientes,  $k_{max}$  es la velocidad específica de inactivación y  $S_1$  es el parámetro que representa la duración del hombro.

$$N_t = (N_0 - N_{res}) e^{-k_{max} t} \cdot \left( \frac{e^{k_{max} S_1}}{1 + (e^{k_{max} S_1} - 1) e^{-k_{max} t}} \right) + N_{res} \quad [3.19]$$

### 3.4.3.2. Ajuste de datos experimentales e índices de error

Para obtener los coeficientes cinéticos de cada modelo descritos anteriormente, es necesario ajustar los valores experimentales a las correspondientes ecuaciones mediante técnicas de regresión no lineal. Los parámetros de los modelos se ajustan a ecuaciones mediante algoritmos interactivos basados en el método de los mínimos cuadrados (*Pernistky et al., 1995; Cho et al., 2003*). En la actualidad, muchos programas informáticos estadísticos permiten realizar estos ajustes. Entre ellos, en este trabajo experimental se utiliza la herramienta Solver y la herramienta de GInaFiT del programa Microsoft Excel (Geeraerd and Van Impe Inactivation Model Fitting Tool).

Para evaluar la calidad de los ajustes de los modelos a los datos experimentales obtenidos se utilizan dos índices: el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el error cuadrático medio (ECM). También se utiliza con este propósito la representación gráfica de los valores estimados frente a los obtenidos experimentalmente.

El coeficiente de determinación,  $R^2$ , se utiliza como una medida global de la calidad del ajuste. Este coeficiente informa sobre la proporción de variabilidad total de la variable dependiente que es explicable por el modelo. Cuanto más cercano sea el valor  $R^2$  a 1, mejor es la precisión predictiva del modelo, y por tanto, más concuerdan los valores predichos con los valores observados. La ecuación del coeficiente de determinación viene determinada por la ecuación 3.20, donde  $\tilde{y}_i$  son los valores estimados  $\bar{y}$  es la media de los valores reales (*Gómez, 2005*).

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\tilde{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad [3.20]$$

El error cuadrático medio, ECM, se define como la raíz cuadrada de la media del cuadrado de los residuos (diferencia entre los valores observados y los valores estimados) y viene determinado por la ecuación 3.21, donde  $n$  es el tamaño de la muestra. Un valor de ECM igual a 0 indica que existe un perfecto acuerdo entre los valores predichos y los valores reales.

$$ECM = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\tilde{y}_i - y)^2}{n}} \quad [3.21]$$

Para comparar modelos diferentes se representan gráficamente los valores observados frente a los valores estimados. Si el modelo se ajusta perfectamente a los datos, los puntos se encuentran distribuidos a lo largo de la línea de equivalencia. La bondad del modelo será mayor cuanto más próximos estén los puntos a dicha línea (Gómez, 2005).

El cálculo de estos parámetros,  $R^2$  y ECM, se realiza con el programa Excel 2003 (Microsoft). Las representaciones gráficas de los valores obtenidos frente a los valores estimados se obtienen con el programa Minitab®.

Los modelos matemáticos aplicados en este trabajo de investigación son modelos primarios y como tales, describen cómo varía el recuento de las poblaciones bacterianas respecto al tiempo. Son ecuaciones matemáticas que describen el cambio de una respuesta, que en este caso son las unidades logarítmicas de inactivación, a lo largo del tiempo y bajo unas condiciones determinadas. A partir de estos modelos, se describen los modelos secundarios, que describen el comportamiento de los parámetros de los modelos primarios al modificarse las condiciones ambientales, como el pH del agua, la concentración de MON,... Finalmente, los modelos terciarios integran los modelos primarios y terciarios para hacer predicciones en base a diversos factores medioambientales. De esta forma, se obtienen ecuaciones complejas que permiten calcular la respuesta de los microorganismos a condiciones diversas, permiten comparar el comportamiento de diferentes microorganismos y determinar unas condiciones adecuadas para alcanzar el grado de inactivación deseado. En este trabajo de investigación se aplican solamente los modelos primarios que mejor se ajustan a las curvas de inactivación obtenidas con los diferentes tratamientos estudiados.





## Capítulo 4.

Eliminación de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp.  
mediante tratamientos convencionales

---



## 4.1. Estudios de eliminación bacteriana en una ETAP real

Con el objeto de evaluar la efectividad de las diferentes etapas que integran una línea de tratamiento de aguas potables a escala real, se lleva a cabo un estudio microbiológico en una potabilizadora localizada en la ribera del Ebro perteneciente a la Comunidad Foral de Navarra. Esta planta de tratamiento capta agua del acuífero aluvial del río Ebro la mayor parte del año, salvo cuando las condiciones de éste no lo permiten, abasteciéndose durante ese periodo directamente de las aguas superficiales del río Ebro.

### 4.1.1. Descripción de la instalación y de las etapas

Esta ETAP consta de varias etapas de tratamiento esquematizadas en la Tabla 4.1. El recorrido del agua por las distintas instalaciones empieza cuando ésta entra en el depósito de agua bruta de 6.000 m<sup>3</sup> de capacidad, donde se le adiciona una dosis media de 2 mg L<sup>-1</sup> de Cl<sub>2</sub>. A continuación, entra a una cámara de homogeneización de 100 m<sup>3</sup> donde se le añade carbón activo diluido previamente en agua. Tras pasar a la cámara de mezcla, de 29 m<sup>3</sup>, donde se le adiciona el coagulante (sulfato de aluminio), la materia en suspensión sedimenta en dos decantadores independientes de 1.034 m<sup>3</sup> cada uno. En los decantadores se adiciona una dosis media de 1 mg L<sup>-1</sup> de Cl<sub>2</sub> llevándose a cabo la oxidación intermedia. Para finalizar, la etapa de filtración tiene lugar en cuatro filtros de arena de 40 m<sup>3</sup> cada uno y la desinfección final se lleva a cabo en los depósitos de almacenamiento con cloro gas.

Tabla 4.1. Etapas de la ETAP de Navarra.

1. Agua bruta	5. Oxidación intermedia con Cl <sub>2</sub> y decantación
2. Preoxidación con Cl <sub>2</sub>	6. Filtración
3. Adsorción	7. Postcloración
4. Coagulación-floculación	

Los tiempos de residencia del agua en cada una de las etapas se calculan en función del caudal a tratar, mostrándose el intervalo de valores mínimos y máximos en

la Tabla 4.2. El caudal de agua que entra a la potabilizadora oscila entre 120-240 L sg<sup>-1</sup>, variando el tiempo total de permanencia del agua en la instalación entre 10 y 20 horas.

Tabla 4.2. Rangos de residencia del agua en cada una de las etapas de la ETAP.

<b>Q agua tratada</b>	120-240 L sg <sup>-1</sup>
<b>Preoxidación</b>	7-17 horas
<b>Adsorción</b>	7-17 minutos
<b>Coagulación-floculación</b>	2-5 minutos
<b>Oxidación intermedia / Decantación</b>	2-3 horas
<b>Filtración</b>	10-13 minutos
<b>Tiempo total</b>	10-20 horas

#### 4.1.2. Muestras

Se toman muestras en siete puntos de la línea de potabilización correspondientes a las etapas de la línea de tratamiento mostradas en la Tabla 4.1.

Para el muestreo se utilizan frascos estériles que contienen tiosulfato sódico en cantidad suficiente para neutralizar el efecto bactericida del cloro residual que puede permanecer en las muestras, ya que es el agente desinfectante que adiciona la ETAP en los procesos de preoxidación, oxidación intermedia y desinfección final. Tras su recogida, las muestras se almacenan refrigeradas y se llevan al laboratorio para su análisis.

En cada una de las muestras se realiza una medición in situ de los parámetros físico-químicos de pH, cloro libre y conductividad y en el laboratorio, el análisis se completa con la medición del carbón orgánico total y el recuento bacteriano de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp. mediante la metodología descrita en el capítulo 3 de la presente memoria.

#### 4.1.3. Resultados de inactivación de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp.

Los resultados de la caracterización físico-química de las muestras tomadas a lo largo del tratamiento de potabilización se muestran en la Tabla 4.3. No se observa prácticamente variación en el pH y conductividad y el carbono orgánico total se reduce al final del tratamiento en un 26 %.

En la Tabla 4.4 y Figura 4.1 se muestra la disminución de la población de células vegetativas de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp. a lo largo de las distintas etapas del proceso, estos últimos resultados objeto del trabajo de investigación de Ibarz (2008). No se detectan esporos de *C. perfringens* en la muestra inicial de agua bruta. Sin embargo, ésta presenta una concentración inicial media de células vegetativas de 200 UFC·100 mL<sup>-1</sup> y una concentración de *Enterococcus* sp. de 120 UFC·100 mL<sup>-1</sup>.

Tabla 4.3. Caracterización físico-química de las muestras en cada punto de muestreo de la ETAP.

Punto de muestreo	pH	Conductividad ( $\mu\text{s cm}^{-1}$ )	TOC (mg L <sup>-1</sup> )	Cl <sub>2</sub> libre (mg L <sup>-1</sup> )
1. Agua bruta	8,20	912	3,1	---
2. Preoxidación	8,32	905	2,9	0,14
3. Adsorción	8,03	918	2,7	ND
4. Coagulación-floculación	7,81	923	2,9	ND
5. Ox. Intermedia / Decantación	7,85	927	2,7	ND
6. Filtración	7,90	929	2,2	0,3-0,4
7. Postcloración	7,90	928	2,3	1,0

ND: no determinado

Tabla 4.4. Eliminación de células vegetativas de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp. en cada punto de muestreo de la ETAP.

Punto de muestreo	<i>C. perfringens</i> (células vegetativas)		<i>Enterococcus</i> sp. (Ibarz, 2008)	
	UFC·100mL <sup>-1</sup>	Inactivación logarítmica	UFC·100mL <sup>-1</sup>	Inactivación logarítmica
1. Agua bruta	200	0	120	0
2. Preoxidación	40	- 0,7	6	-1,3
3. Adsorción	48	- 0,7	3	-1,6
4. Coagulación- floculación	22	- 0,9	2	-1,7
5. Ox. Intermedia/ Decantación	0	-2,3	0	-2
6. Filtración	0	-2,3	0	-2
7. Postcloración	0	-2,3	0	-2

Se observa para ambas bacterias que conforme avanza el tratamiento, las poblaciones van disminuyendo hasta llegar a las etapas de oxidación intermedia-decantación y filtración, donde las poblaciones supervivientes en ambos casos son nulas.

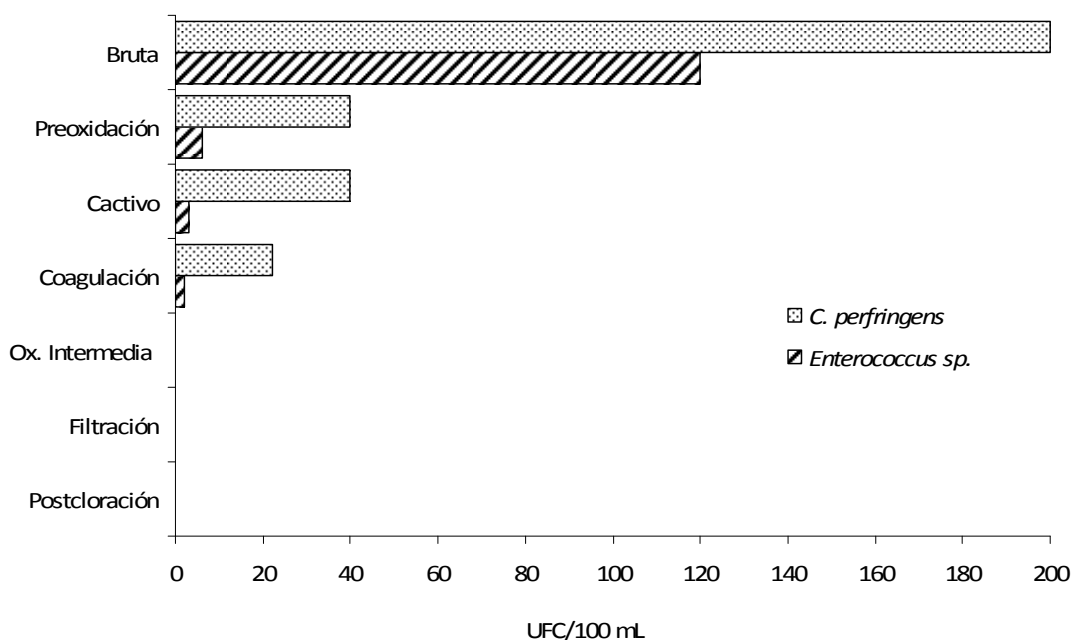


Figura 4.1. Eliminación de *C. perfringens* y *Enterococcus sp.* (Ibarz, 2008) a lo largo de las diferentes etapas del proceso de potabilización a escala real.

Las etapas que mayor grado de eliminación bacteriana presentan son la preoxidación y la oxidación intermedia, con una reducción de 0,7 y 1,4 ciclos logarítmicos respectivamente sobre *C. perfringens* y de 1,3 y 0,3 sobre *Enterococcus sp.* Es de esperar que en estas etapas se produzca la mayor parte de inactivación de microorganismos patógenos, pues tienen como principal finalidad la desinfección. Además, como refleja la Tabla 4.3, permanece una concentración residual de cloro que sigue ejerciendo su acción bactericida tras la primera oxidación de la materia orgánica del agua. La precipitación química (coagulación y floculación) también consigue reducir parte de las poblaciones bacterianas, 0,2 unidades logarítmicas de *C. perfringens* y 0,1 unidades de *Enterococcus sp.*, ya que al formarse los flóculos pueden quedarse adheridos o encerrados los microorganismos en su interior, siendo arrastrados hacia el fango. En el resto de las etapas el grado de eliminación es mucho menor, aunque debido al solapamiento de las etapas entre sí y a la baja concentración bacteriana de

partida, no se puede determinar con exactitud cuál es la verdadera influencia del resto de etapas sobre el fenómeno de desinfección.

Payment (1985) estudia el nivel de inactivación de indicadores bacterianos y virales en cada una de las etapas de un grupo de potabilizadoras, resultando los procesos de precloración, coagulación y sedimentación los más eficientes en la reducción de dichos indicadores, coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente análisis.

Además de la desinfección, otro de los objetivos de estas etapas es conseguir que la media de la turbidez final no sobrepase 1 UNT, ya que los microorganismos aglomerados o adsorbidos por partículas se protegen contra la desinfección en estos casos (OMS, 2011).

En la última etapa, la postcloración, se determina una concentración media de cloro libre residual de 1 mg L<sup>-1</sup>, permitiendo que el agua potable llegue a los puntos de consumo en buen estado sanitario.

El agua potable obtenida al final de este tratamiento convencional de potabilización cumple con los criterios exigidos por la actual legislación vigente (RD 140/2003).

Payment y Franco (1993) establecen necesario el análisis rutinario de *C. perfringens* como indicador de la presencia de otros microorganismos resistentes a los tratamientos convencionales, como enterovirus y quistes de protozoos. La presencia de *C. perfringens* en una muestra de agua tratada no debe aceptarse y por tanto, debe desecharse como agua apta para consumo humano. Hijnen (2000b), tras un trabajo de investigación sobre la detección de indicadores bacterianos en diferentes etapas de una ETAP, señala la necesidad de filtrar volúmenes superiores al legislado (100 mL) como técnica rutinaria de filtración, ya que después de que el agua pasa por diversas etapas de la línea de tratamiento, la presencia de estos indicadores disminuye y son difíciles de detectar con el volumen establecido. Recomienda volúmenes en torno a los 100 L o superiores para asegurar la eficacia de las etapas finales y de todo el tratamiento.



## 4.2. Estudios de eliminación bacteriana a escala de laboratorio

En una potabilizadora, tal y como se refleja en el apartado 4.1.1 del presente capítulo, todas las etapas siguen un diagrama de flujo en serie, siendo difícil saber el grado de aportación de cada una de ellas al proceso completo de desinfección. Es de esperar que la mayor acción bactericida corresponda a las etapas de preoxidación y oxidación intermedia, por ser en ellas donde se adiciona el desinfectante, pero también puede ocurrir que la influencia del resto de etapas sea mayor que el detectado en los análisis de la línea de tratamiento a escala real.

Por tanto, el objetivo de esta parte de la investigación se centra en simular a escala de laboratorio cada una de las etapas de manera individual, con el objetivo de determinar su influencia sobre las células vegetativas de *C. perfringens*. La etapa de cloración se estudia también sobre esporos y *Enterococcus* sp. La influencia del resto de etapas han sido estudiadas sobre *Enterococcus* sp. por Ibarz (2008).

### 4.2.1. Muestras

#### 4.2.1.1. Muestras de agua natural

Las muestras de agua natural utilizadas durante la experimentación en el laboratorio de la presente Tesis Doctoral, proceden de las aguas superficiales del Canal Imperial de Aragón. Esta infraestructura canaliza las aguas a partir de una derivación del río Ebro a la altura del término municipal de Fontellas (Navarra), abasteciendo a varios municipios situados a ambos lados del canal y finalmente a Zaragoza.

La toma de muestras se lleva a cabo 500 metros antes de la captación de la potabilizadora de Casablanca, instalación que abastece de agua potable a la ciudad de Zaragoza. Se utilizan frascos recolectores estériles y tras recoger las muestras, se mantienen a una temperatura inferior a 10 °C hasta llegar al laboratorio. Una vez allí, se analizan sus parámetros físico-químicos y se procede a conservarlas a -20 °C hasta su posterior utilización.

La Tabla 4.5 muestra los resultados de caracterización de la muestra de agua natural.

Tabla 4.5. Caracterización de la muestra de agua natural.

<b>pH</b>	7,91 - 8,29
<b>Temperatura</b>	17,8 - 20,8 °C
<b>Turbidez</b>	86-144 NTU
<b>Conductividad</b>	550 – 1.368 $\mu\text{s cm}^{-1}$
<b>Carbono orgánico total</b>	3,3- 6 $\text{mg L}^{-1}$
<b><i>C. perfringens</i></b>	$1 \cdot 10^2 - 4 \cdot 10^2 \text{ UFC} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$
<b><i>Enterococcus sp.</i></b>	$1 \cdot 10^2 - 5 \cdot 10^2 \text{ UFC} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$

#### 4.2.1.2. Muestras de agua natural fortificadas

Tras caracterizar las muestras de agua natural, se observa en la Tabla 4.5 una población de *C. perfringens* y *Enterococcus sp.* del orden de  $10^2 \text{ UFC} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ , concentraciones que no permiten determinar la influencia de los tratamientos de desinfección de estudio. Por ello, se aumenta de manera artificial la concentración bacteriana originaria presente en el agua natural, partiendo así de una “muestra fortificada”.

Para ello, previamente a la realización de cada uno de los tratamientos de estudio, la muestra de agua que va a ser utilizada se esteriliza en una botella de vidrio Pyrex de 1 L para eliminar las bacterias presentes en el día del muestreo y que hayan podido sobrevivir al periodo de congelación y así evitar cualquier interacción de la bacteria de estudio con otros microorganismos (Medema *et al.*, 1997). Posteriormente, a partir de cultivos puros de *C. perfringens* y *Enterococcus sp.*, se preparan suspensiones bacterianas concentradas que posteriormente se añaden a las muestras de agua natural.

#### *Fortificación con células vegetativas de C. perfringens*

La cepa de *C. perfringens* utilizada en la experimentación del presente trabajo de investigación es suministrada por el Hospital Clínico Lozano Blesa de Zaragoza, la cual se aisló a partir de un caso clínico en humana.

Una vez en el laboratorio, se procede a su confirmación mediante una serie de pruebas bioquímicas que se recogen en la Tabla 4.6 (Gamazo *et al.*, 2005; Environmental Agency, 2010). Los resultados muestran que *C. perfringens* fermenta los azúcares glucosa

y lactosa con producción de gas y ácido, es inmóvil, licua la gelatina y reduce los nitratos a nitritos.

Tras confirmar el género y la especie, la cepa “madre” se conserva en viales pequeños (1,5 mL) con leche desnatada estéril que funciona como un agente crioprotector, congelada a -20°C (Gamazo *et al.*, 2005); a partir de estos viales se realiza la fortificación bacteriana del agua natural previamente a cada experimento.

Tras descongelar el criovial, se trasvasa con un asa de siembra un inóculo a un tubo con caldo tioglicolato con resazurina, un medio líquido de enriquecimiento (Tabla 4.7). Tras un periodo de incubación de 24 h a 37 °C en condiciones de anaerobiosis, se realiza una siembra en superficie con hisopo en agar Schaedler enriquecido con sangre (5% de sangre de carnero desfibrinada estéril) (Tabla 4.8 y Figura 4.2). Se vuelven a incubar las placas durante 24 h a 37 °C en anaerobiosis para así obtener cultivo joven y abundante, facilitando la posterior preparación de la suspensión bacteriana (Lanao *et al.*, 2008, 2010).

Tabla 4.6. Pruebas bioquímicas de confirmación de *C. perfringens*.

Medios de cultivo	Propiedad	Condiciones Incubación	Resultado
<b>Agar Kligler</b>	Fermentación glucosa y lactosa Generación SH <sub>2</sub> y gas	37 °C/ 48h Aerobiosis y Anaerobiosis	Y <sub>G</sub> /Y/+
<b>Agar movilidad</b>	Movilidad		-
<b>Medio gelatina</b>	Capacidad de licuefacción de la gelatina		+
<b>Medio reducción nitratos a nitritos</b>	Capacidad de reducir los nitratos a nitritos		+
<b>Lactosa gelatina</b>	Fermentación lactosa		+/+
<b>Agar Nitrato Movilidad</b>	Reducción de nitratos a nitritos y movilidad		+/-

El agar Schaedler-sangre no es un tipo de agar selectivo, por lo que en él pueden crecer cualquier tipo de bacterias. Es importante la observación de las colonias crecidas tras la incubación para ver si hay cultivo homogéneo, trabajando en todo momento en torno al mechero Bunsen para evitar contaminación ambiental. Las

colonias de *C. perfringens* obtenidas en este medio dan colonias redondas, lisas, de bordes netos, abombadas, de color crema a amarillas. A veces, algunas cepas presentan colonias atípicas (planas, rugosas, con bordes lobulados) mezcladas entre las típicas. En agar sangre se produce una hemólisis visible alrededor de las colonias, de extensión variable según el tipo de hemolisinas producidas (Figura 4.2) (Bourgeois *et al.*, 1994).

Tabla 4.7. Composición del caldo tioglicolato con resazurina.

Ingredientes	Concentración (g L <sup>-1</sup> )
Extracto de levadura	5,0
Digerido pancreático de caseína	15,0
Dextrosa (anhidro)	5,0
L-cistina	0,5
Cloruro sódico	2,5
Tioglicolato sódico	0,5
Resazurina	0,001
Agar	0,75

Tabla 4.8. Composición del agar Schaedler.

Ingredientes	Concentración (g L <sup>-1</sup> )
Peptona de caseína	5,60
Peptona de soja	1,00
Peptona de carne	5,00
Peptona de levadura	5,00
Glucosa	5,80
Cloruro sódico	1,70
Fosfato de dipotasio	0,80
Tampón Tris	3,00
L-Cisteína HCl	0,40
Hemina	0,01
Agar	15,00

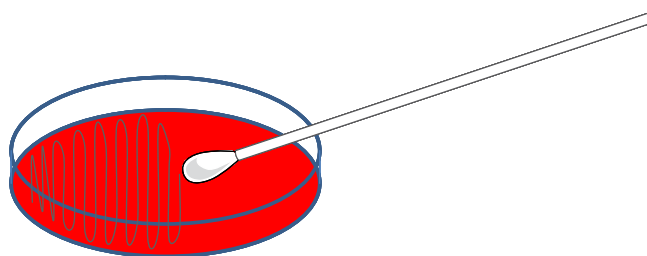


Figura 4.2. Colonias de *C. perfringens* en Agar Schaedler-sangre y técnica de siembra en superficie con hisopo.

A partir de la placa cultivada de agar Schaedler y con un asa de siembra estéril, se trasvasan las colonias crecidas a un tubo que contiene una disolución de NaCl 0,9%

estéril. Una vez se consigue en el tubo la turbidez equivalente al patrón 2 de la escala de McFarland, se vierte el contenido del mismo en la muestra de agua natural. De esta forma se consigue partir en cada uno de los experimentos realizados de una concentración inicial de células vegetativas de aproximadamente  $10^7$ - $10^8$  UFC·100 mL<sup>-1</sup>. La escala de McFarland relaciona la turbidez de unos patrones de sulfato bórico con el número conocido de bacterias presentes en una muestra (Gamazo *et al.*, 2005).

Hay que tener en cuenta que las poblaciones bacterianas iniciales para cada uno de los experimentos realizados no van a ser exactamente las mismas debido a la propia dificultad de preparación y calibración de la suspensión celular concentrada.

### **Fortificación con esporos de *C. perfringens***

La fortificación de las muestras con esporos se realiza a partir de la misma cepa de *C. perfringens* descrita en el apartado anterior. Tras descongelar el vial, con un asa de siembra se trasvasa un inóculo a un tubo con caldo tioglicolato con resazurina y se incuba a 37 °C durante 24 h en anaerobiosis.

Tras la incubación, se inocula 1 mL del cultivo en caldo de esporulación (Tabla 4.9) acorde al procedimiento descrito por Duncan y Strong (1968), incubándose nuevamente a 37 °C durante 72 h en condiciones de anaerobiosis. Después de la incubación, los esporos se recuperan mediante centrifugación (10.000 r.p.m., 15 minutos). El cultivo se lava dos veces con agua de peptona al 0,1%. A continuación, la suspensión de esporos se calienta a 80 °C durante 15 minutos para eliminar las células vegetativas presentes. Se enfría inmediatamente bajo el grifo. Finalmente, se realizan tres lavados con agua de peptona al 0,1 % para obtener la suspensión de esporos final (Lanao *et al.*, 2010).

Tabla 4.9. Composición del caldo de esporulación Duncan-Strong.

<b>Ingredientes</b>	<b>Concentración (g · 100mL<sup>-1</sup>)</b>
Extracto de levadura	0,4
Proteasa peptona	1,5
Almidón soluble	0,4
Tioglicolato sódico	0,1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,0

Tras adicionar esta suspensión a la muestra de agua natural se obtiene una concentración de esporos de  $10^3$  UFC·100 mL<sup>-1</sup>.

#### **Fortificación con *Enterococcus* sp.**

La cepa de *Enterococcus* sp. utilizada proviene del stock del grupo de investigación Calidad y Tratamiento de Aguas. Al estar ya identificada y haber sido utilizada en otros estudios previos (Ibarz, 2008; Regalado, 2008), no se considera necesario realizar ninguna prueba bioquímica de confirmación, salvo la tinción de Gram (apartado 3.3.2.8).

De la misma manera que con *C. perfringens*, la fortificación de las muestras de agua natural se realiza a partir de un vial congelado a -20 °C. Tras descongelarse, se toma un inóculo con el asa de siembra y se realiza un aislamiento en superficie por agotamiento (Figura 4.3) en agar nutritivo (Tabla 4.10), incubándose las placas a 37 °C durante 48 horas en aerobiosis con el fin de disponer de un cultivo bacteriano joven y abundante. El agar nutritivo no es un tipo de agar selectivo, por lo que en él puede crecer cualquier tipo de bacterias. Es importante observar tras la incubación las colonias crecidas para ver si hay cultivo homogéneo. Las colonias de *Enterococcus* sp. en este agar son de color crema, redondas, con límite definido (Figura 4.4).

Tabla 4.10. Composición del agar nutritivo.

Ingredientes	Concentración (g L <sup>-1</sup> )
Peptona (proteína parcialmente digerida)	5,0
Extracto de carne	3,0
Cloruro de sodio	8,0
Agar	15,0

Tras el periodo de incubación, se prepara una suspensión bacteriana concentrada transfiriendo las colonias a un tubo con suero fisiológico (NaCl 0,9%). Para saber el grado de turbidez de la suspensión a alcanzar y por tanto, la concentración bacteriana con la que trabajar, se utiliza el parámetro de densidad óptica; éste se mide mediante la absorbancia de la suspensión a una longitud de onda de 600 nm, estando

directamente relacionado este valor con la concentración de bacterias presentes en la solución (Ibarz, 2008). Tras adicionar la suspensión de *Enterococcus* sp. al agua natural, la concentración bacteriana alcanzada se sitúa entorno a  $10^8$  UFC·100 mL<sup>-1</sup>.

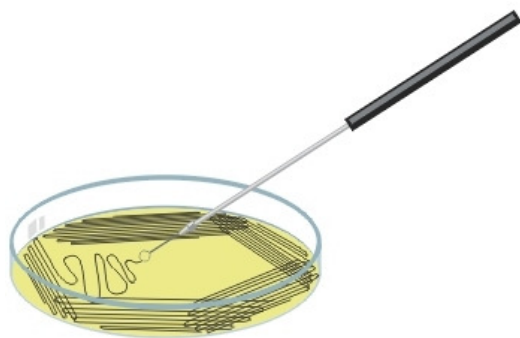


Figura 4.3. Técnica de aislamiento en superficie por agotamiento.

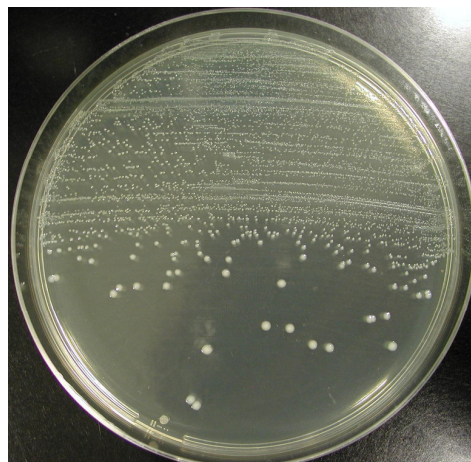


Figura 4.4. Colonias de *Enterococcus* sp. en agar nutritivo.

## 4.2.2. Preoxidación con hipoclorito sódico

### 4.2.2.1. Procedimiento experimental

Los ensayos de preoxidación con hipoclorito sódico se llevan a cabo con tres muestras de agua natural fortificadas en cada caso con células vegetativas y esporos de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp. (apartado 4.2.1.2).

El desinfectante que se utiliza es hipoclorito sódico (NaClO, 5%, Panreac), adicionando a la muestra la dosis correspondiente a su demanda de cloro, tal y como se describe en el apartado 3.2.1.

Tras la adición del oxidante, la muestra clorada se mantiene en agitación a 100 r.p.m. para favorecer su homogeneización. A partir del instante en que se adiciona el reactivo a la muestra se toman alícuotas a distintos intervalos para valorar el efecto del cloro sobre la población de estudio en el tiempo. En los experimentos con células vegetativas y *Enterococcus* sp., la duración del tratamiento es de 10 minutos, alargándose a 30 minutos en el caso de los esporos.

El cloro residual de las muestras extraídas se neutraliza con tiosulfato sódico para evitar que siga ejerciendo su efecto bactericida. Las muestras se procesan de inmediato tras la finalización del experimento.

#### 4.2.2.2. Resultados de inactivación de células vegetativas de *C. perfringens*

La demanda de cloro de la muestra fortificada con células vegetativas es de 4,4 mg Cl<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. La Tabla 4.11 refleja las poblaciones bacterianas supervivientes en cada tiempo muestreado y el cloro libre residual en cada instante estudiado. En la Figura 4.5 se representa la curva de inactivación de la población durante el tratamiento.

Tabla 4.11. Recuentos de células vegetativas de *C. perfringens* durante el tratamiento de cloración (UFC·100mL<sup>-1</sup>) y concentración de cloro residual (mg L<sup>-1</sup>).

Tiempo (minutos)	0	0,16	0,5	1	5	10
N <sub>t</sub>	2,5 · 10 <sup>8</sup>	1,7·10 <sup>4</sup>	2·10 <sup>3</sup>	5,2·10 <sup>2</sup>	3,5·10 <sup>0</sup>	0
Cl <sub>2</sub> residual	4,4	4,2	3,9	3,6	2,6	2,0

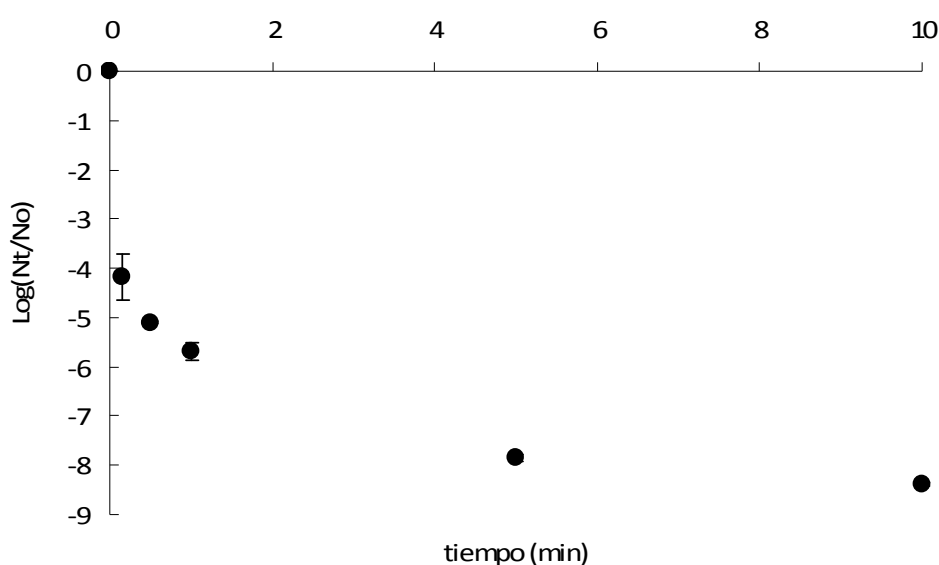


Figura 4.5. Inactivación de las células vegetativas de *C. perfringens* en el tratamiento de preoxidación con hipoclorito sódico. N<sub>0</sub>= 2,5 · 10<sup>8</sup> UFC·100 mL<sup>-1</sup>.



En el primer tramo del ensayo la pendiente de la curva de inactivación es muy pronunciada, derivándose en un nivel de desinfección muy elevado en poco tiempo; ya sólo en el primer minuto de tratamiento se alcanza una reducción bacteriana de  $5,7 \pm 0,2$  unidades logarítmicas con un consumo de cloro de  $1,1 \text{ mg L}^{-1}$ . Tras esta rápida disminución inicial de las poblaciones, la inactivación de las células vegetativas se lleva a cabo progresivamente hasta producirse la desinfección completa de la muestra a los 10 minutos de tratamiento, con un resultado final de 8,4 unidades logarítmicas inactivadas.

#### 4.2.2.3. Resultados de inactivación de esporos de *C. perfringens*

La demanda de cloro de la muestra fortificada con esporos es de  $5,9 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ . En la Tabla 4.12 se muestran las poblaciones esporuladas de *C. perfringens* que permanecen en cada intervalo de tiempo muestreado. En la Figura 4.6 se representa su curva de inactivación a lo largo de 30 minutos de experimento.

Tabla 4.12. Recuentos de esporos de *C. perfringens* durante el tratamiento de cloración ( $\text{UFC} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ ) y concentración de cloro residual ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

Tiempo (minutos)	0	0,16	0,5	1	3	7	10	20	30
$N_t$	$3,7 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^2$	$1,3 \cdot 10^2$	$8 \cdot 10^1$	$8 \cdot 10^1$	$6 \cdot 10^1$	$6 \cdot 10^1$	$6 \cdot 10^1$	$4 \cdot 10^1$
$\text{Cl}_2$ residual	5,9	5,7	5,5	5,2	4,9	4,6	4,4	3,9	3,3

Durante los primeros 10 segundos de tratamiento el número de esporos se ve seriamente disminuido, produciéndose un nivel de inactivación de  $1,4 \pm 0,1$  unidades logarítmicas. A partir de este instante la tendencia de inactivación se mantiene prácticamente constante durante el resto del experimento, a pesar de que continúa disuelto en el agua una concentración de cloro residual ejerciendo su acción oxidante y desinfectante. En el último punto muestreado la inactivación obtenida es de 1,9 unidades logarítmicas.

Estos resultados ponen de manifiesto que las formas esporuladas de *C. perfringens* son mucho más resistentes al tratamiento de cloración que sus formas vegetativas.

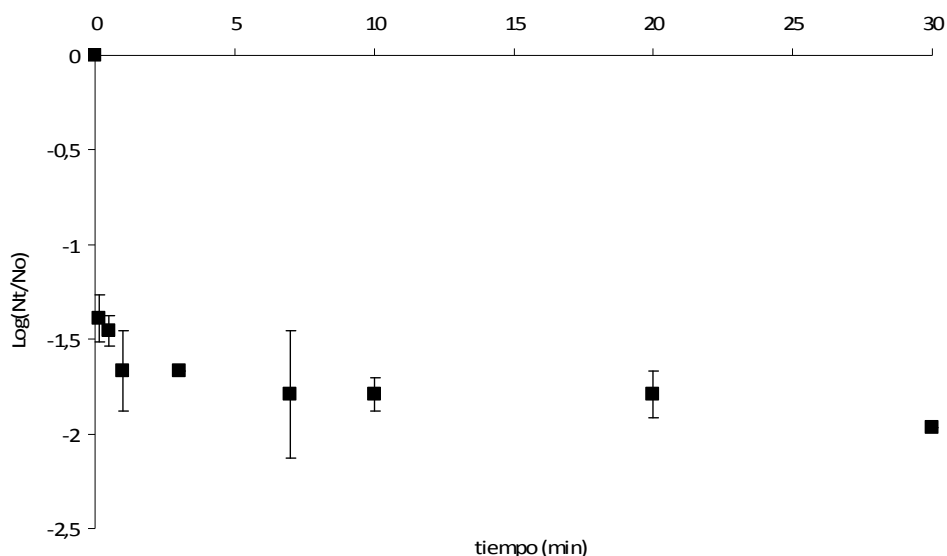


Figura 4.6. Inactivación de la población esporulada de *C. perfringens* durante el tratamiento de preoxidación con hipoclorito sódico.  $N_0 = 3,7 \cdot 10^3$  UFC  $\cdot 100$  mL $^{-1}$ .

Venczel (2004) recoge ciclos de inactivación de 1-2 logaritmos sobre esporos de *C. perfringens* como máximo en un tiempo de 60 minutos en agua tamponada con una dosis de cloro de 2 mg L $^{-1}$ , observando cinéticas de inactivación muy prolongadas en el tiempo. En este experimento, con una dosis de cloro de 2,6 mg L $^{-1}$  se ha inactivado prácticamente dos unidades logarítmicas en 30 minutos. En consecuencia, a la vista de la resistencia de estas formas bacterianas, es altamente recomendable realizar el control de ambas formas celulares de *C. perfringens* en aguas de abastecimiento humano, tal y como establece la legislación vigente (RD 140/2003).

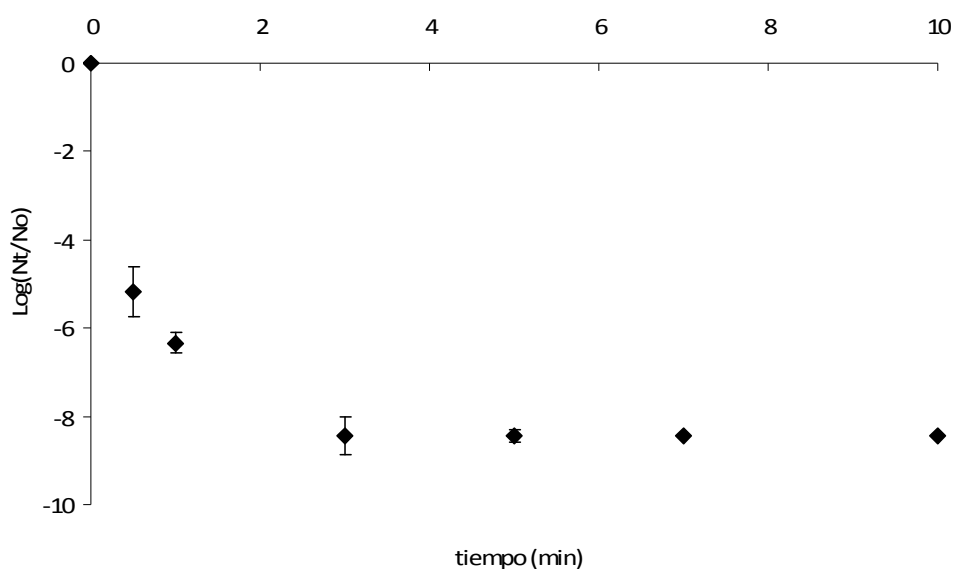
#### 4.2.2.4. Resultados de inactivación de *Enterococcus* sp.

La demanda de cloro de la muestra fortificada es de 3,8 mg Cl $_2$  L $^{-1}$ . La Tabla 4.13 refleja la población de *Enterococcus* sp. superviviente en cada tiempo muestreado durante el proceso de cloración, así como el cloro residual presente a lo largo del mismo. La Figura 4.7 representa la curva de eliminación bacteriana durante el ensayo.

Tabla 4.13. Recuentos de *Enterococcus* sp. durante el tratamiento de cloración (UFC·100mL<sup>-1</sup>) y concentración de cloro residual (mg L<sup>-1</sup>).

Tiempo (minutos)	0	0,5	1	3	5	7	10
N <sub>t</sub>	2,8·10 <sup>8</sup>	1,9·10 <sup>3</sup>	1,3·10 <sup>2</sup>	0	0	0	0
Cl <sub>2</sub> residual	3,8	3,6	3,3	3,0	2,9	2,8	2,7

Tras adicionar la demanda de cloro correspondiente a la muestra se observa una rápida disminución poblacional durante los primeros instantes de estudio. Este comportamiento se observa también en los ensayos de cloración de las células vegetativas y esporos de *C. perfringens*, poniéndose de manifiesto la elevada acción desinfectante del hipoclorito sódico.

Figura 4.7. Inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de preoxidación con hipoclorito sódico. N<sub>0</sub>= 2,8 ·10<sup>8</sup> UFC ·100 mL<sup>-1</sup>.

A los 30 segundos de tratamiento se obtiene una reducción bacteriana de 5,2 ± 0,5 ciclos logarítmicos, alcanzándose al tercer minuto de experimento, con un consumo de cloro de 0,8 mg Cl<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> la desinfección completa de la muestra, 8,5 unidades logarítmicas de inactivación.

La desaparición bacteriana de *Enterococcus* sp. sucede con una mayor rapidez que la desaparición de *C. perfringens*, tanto en el caso de la población vegetativa como

en la esporulada, necesitando una dosis de cloro menor ( $0,8 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ ) para reducir las poblaciones de partida a cero, en contraposición con dosis mayores en el caso de las células vegetativas de *C. perfringens* ( $2,4 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ ). Los esporos, bajo estas condiciones de estudio, no alcanzan una desinfección completa al final del ensayo.

Por tanto, los esporos de *C. perfringens* muestran una mayor resistencia al tratamiento de cloración, seguido por sus formas vegetativas y finalmente, por *Enterococcus* sp.

#### 4.2.2.5. Modelización cinética

Las curvas de inactivación cóncavas que describen la muerte de las células vegetativas y esporos de *C. perfringens* y de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de cloración se analizan mediante 3 modelos matemáticos: el modelo de Hom modificado, el modelo bifásico y el modelo de Mafart.

El modelo de Hom modificado asume que la población bacteriana se inactiva a lo largo del tratamiento conforme el desinfectante se va descomponiendo, representado este proceso de desaparición por la constante  $k'$ . El modelo bifásico reconoce la existencia de dos poblaciones con distinta resistencia al tratamiento, respondiendo ambas a una cinética de primer orden. Finalmente, el modelo de Mafart también asume que existe una distribución de resistencias frente al tratamiento dentro de la población, pero estas resistencias siguen la distribución de Weibull. En el apartado 3.4.3 de la presente memoria se desarrollan con más detalle cada uno de estos modelos.

Las Tablas 4.14, 4.15 y 4.16 muestran los parámetros cinéticos y el ajuste de cada uno de los modelos a los resultados experimentales obtenidos para las tres formas bacterianas de estudio, mediante el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el error cuadrático medio (ECM).

La observación de los índices ECM y  $R^2$  indica, en conjunto, una buena adecuación de los tres modelos a los valores experimentales de inactivación obtenidos. Los valores de ECM están próximos al valor 0 y en paralelo, el valor de  $R^2$  está muy próximo al valor 1.

Tabla 4.14. Parámetros cinéticos del modelo de Hom modificado aplicados sobre la inactivación de las tres formas bacterianas de estudio en el tratamiento de cloración.

	$k$ (min <sup>-1</sup> )	$k'$ (min <sup>-1</sup> )	$n$	$m$	ECM	R <sup>2</sup>
<b>Células vegetativas de <i>C. perfringens</i></b>	5,281	0,291	0,07	0,20	0,092	0,99
<b>Esporos de <i>C. perfringens</i></b>	1,526	0,669	0,03	0,09	0,05	0,98
<b><i>Enterococcus</i> sp.</b>	2,077	0,45	1,01	0,50	0,12	0,99

Tabla 4.15. Parámetros cinéticos del modelo bifásico aplicados sobre la inactivación de las tres formas bacterianas de estudio en el tratamiento de cloración.

	P	$k_1$ (min <sup>-1</sup> )	$k_2$ (min <sup>-1</sup> )	ECM	R <sup>2</sup>
<b>Células vegetativas de <i>C. perfringens</i></b>	0,999994	59,91	0,81	0,691	0,97
<b>Esporos de <i>C. perfringens</i></b>	0,9753	25,68	0,03	0,094	0,98
<b><i>Enterococcus</i> sp.</b>	0,99999997	23,79	0,25	0,57	0,96

Tabla 4.16. Parámetros cinéticos del modelo de Mafart aplicados sobre la inactivación de las tres formas bacterianas de estudio en el tratamiento de cloración.

	p	$\delta$ (min)	ECM	R <sup>2</sup>
<b>Células vegetativas de <i>C. perfringens</i></b>	0,17	0,000039	0,129	0,99
<b>Esporos de <i>C. perfringens</i></b>	0,06	0,0006	0,06	0,99
<b><i>Enterococcus</i> sp.</b>	0,13	0,0000005	0,50	0,96

Si se comparan los valores de los índices cinéticos de cada uno de los modelos entre las tres formas bacterianas de estudio se puede observar que, para el primer modelo, el modelo de Hom modificado (Tabla 4.14), la constante de velocidad de inactivación ( $k$ ) de las células vegetativas de *C. perfringens* presenta el valor más alto, mostrando una mayor sensibilidad al tratamiento durante los primeros instantes con respecto a *Enterococcus* sp. y sus esporos.

Respecto al modelo bifásico (Tabla 4.15), el valor P indica la fracción de la población sensible al tratamiento. A nivel logarítmico se traduce en que la población resistente de las formas vegetativas de *C. perfringens* aparece después de inactivarse 5,3 ciclos logarítmicos, la de los esporos después de 1,6 ciclos y finalmente, la de *Enterococcus* sp., tras una inactivación de 7,5 unidades logarítmicas. Los valores  $k_1$  y  $k_2$

representan constantes que caracterizan la velocidad de inactivación de la población sensible y resistente al tratamiento, respectivamente. Los valores de la constante  $k_1$  son muy superiores a los valores de la constante  $k_2$  para las tres formas bacterianas, por lo que coexisten aparentemente dos poblaciones de resistencia diferentes.

Del modelo de Mafart (Tabla 4.16), se deriva que para las tres formas estudiadas, el valor del parámetro de forma,  $p$ , es inferior a 1 indicando que las curvas de inactivación presentan una forma cóncava, lo que se traduce en la aparición de una cola. El parámetro de escala,  $\delta$ , se corresponde con el tiempo necesario para reducir el primer ciclo logarítmico decimal de la población bacteriana.

Las Figuras 4.8, 4.9 y 4.10 muestran el ajuste de los tres modelos a las curvas de inactivación de las células vegetativas y esporos de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp., respectivamente. Se puede observar un ajuste bastante bueno de las curvas estimadas a partir de los modelos matemáticos sobre la curva trazada por los datos experimentales en los tres casos.

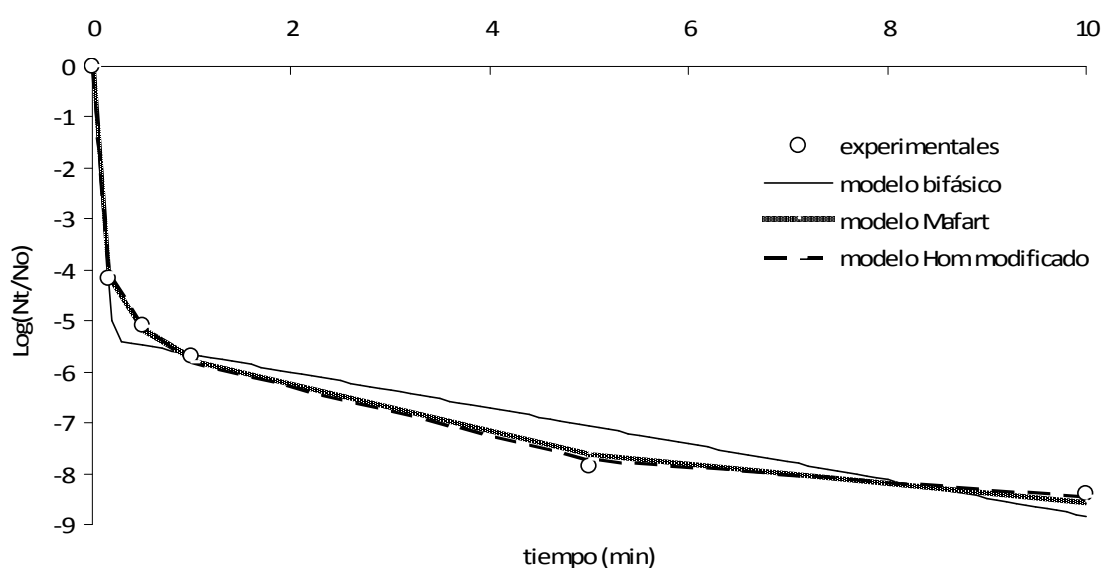


Figura 4.8. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de las células vegetativas de *C. perfringens* mediante el tratamiento de cloración.

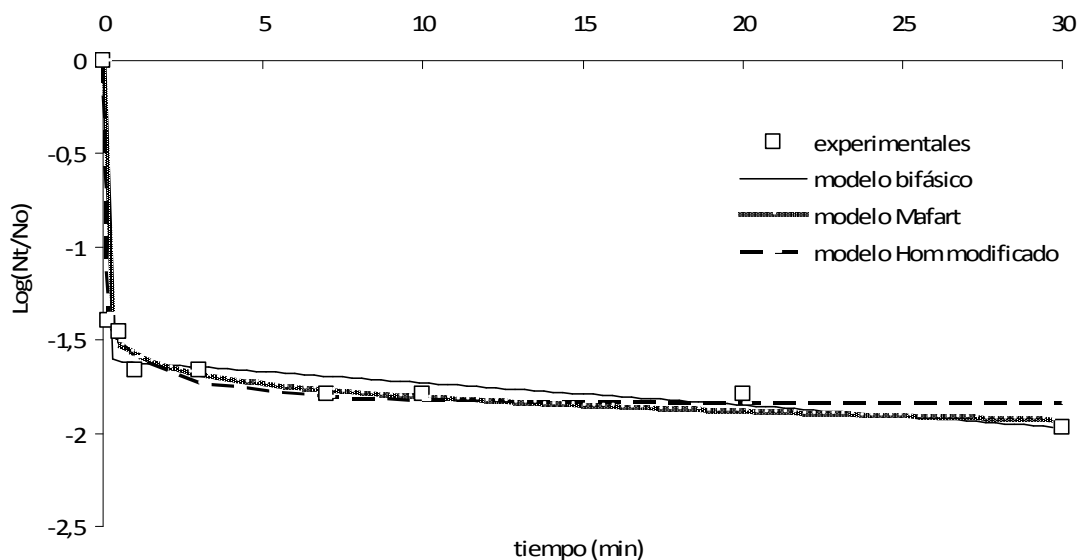


Figura 4.9. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de los esporos de *C. perfringens* mediante el tratamiento de cloración.

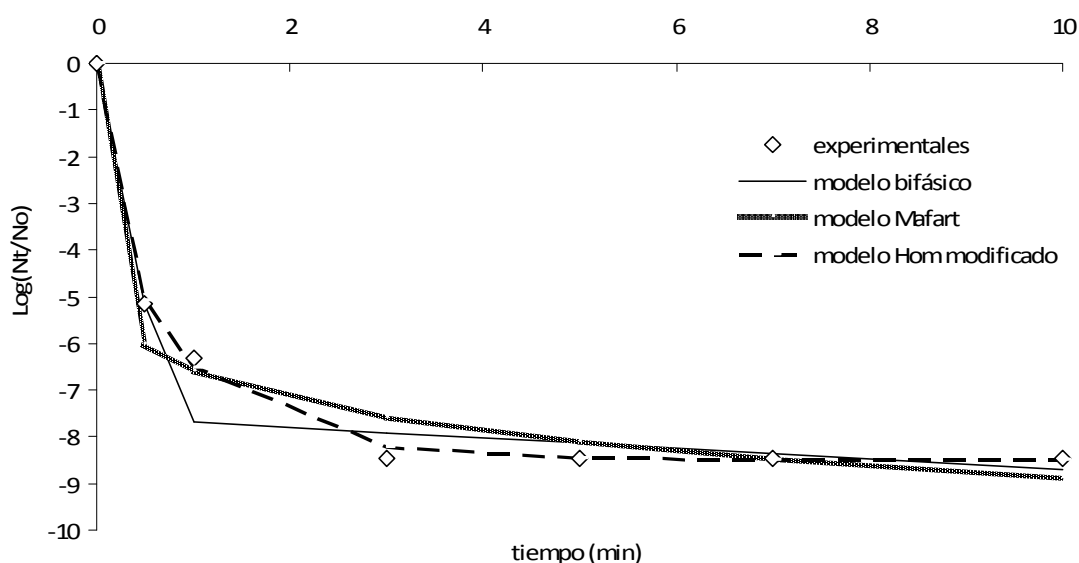


Figura 4.10. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de *Enterococcus* sp. mediante el tratamiento de cloración.

La Figura 4.11 muestra la representación gráfica de los valores logarítmicos de inactivación observados en el tratamiento de cloración sobre las formas vegetativas de *C. perfringens* frente a los valores logarítmicos de inactivación estimados por los tres modelos matemáticos aplicados.

Si el modelo se ajusta perfectamente a los datos, los puntos se encuentran distribuidos a lo largo de la línea de equivalencia. La bondad del modelo es mayor

cuanto más próximos están los puntos a dicha línea. No se observa prácticamente dispersión de los puntos respecto a la recta, por lo que los tres modelos se ajustan adecuadamente a los resultados de inactivación experimentales obtenidos.

La Figura 4.12 y 4.13 muestran el mismo tipo de representación gráfica, valores de inactivación obtenidos frente a los valores de inactivación logarímicamente estimados, en los tratamientos de cloración sobre los esporos y *Enterococcus* sp. bajo los tres modelos estudiados. Sobre los esporos, para los tres modelos, la distribución de la nube de puntos están muy próximas a la recta; sin embargo, para *Enterococcus* sp., el modelo de Hom modificado es el modelo que presenta los puntos más cercanos a dicha recta, por lo que se puede decir que es el modelo que mejor se ajusta a los valores experimentales obtenidos.



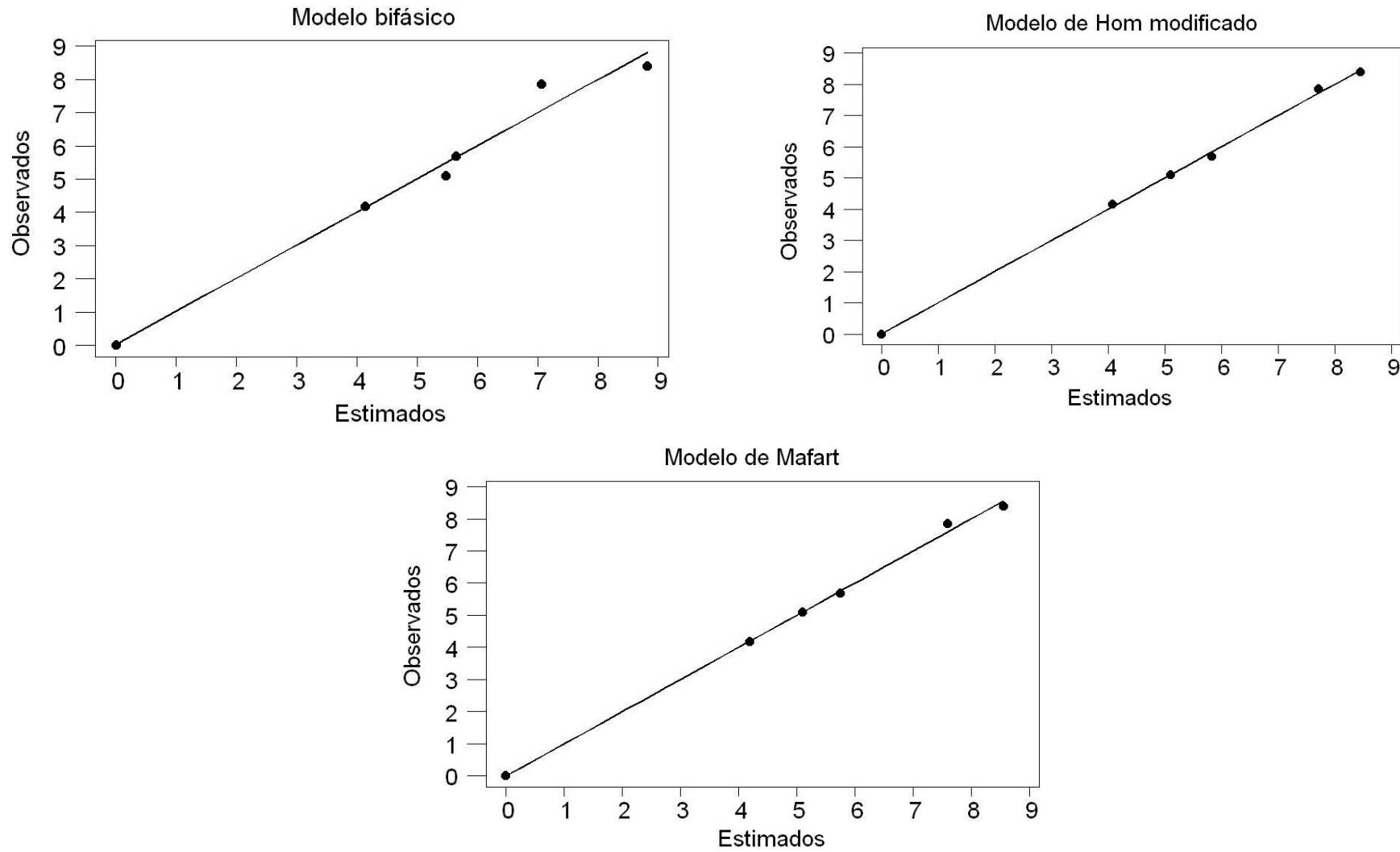


Figura 4.11. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica observada experimentalmente y la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados sobre las células vegetativas de *C.perfringens* mediante tratamiento de cloración.

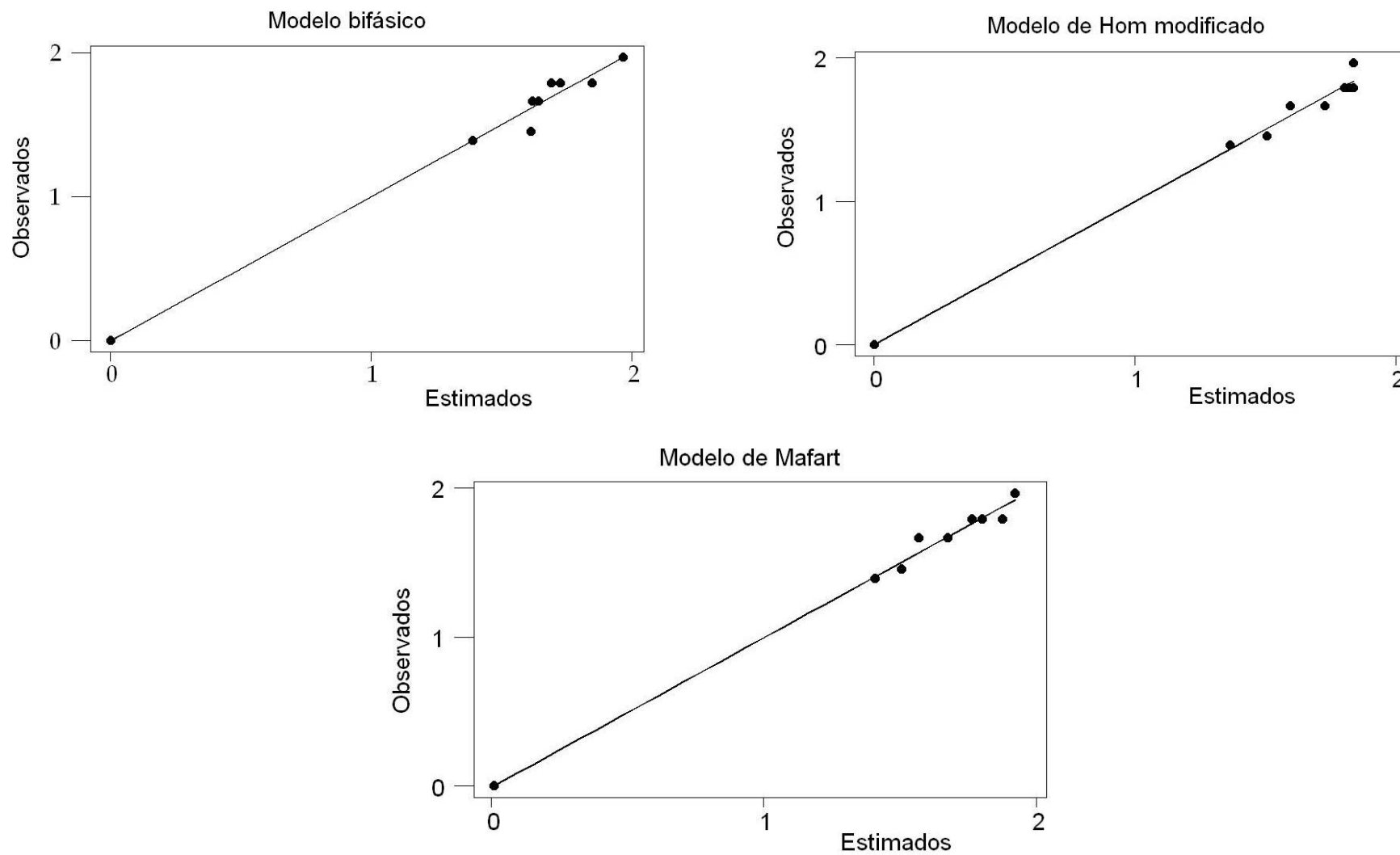


Figura 4.12. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica observada experimentalmente y la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados sobre los esporos de *C.perfringens* mediante tratamiento de cloración.

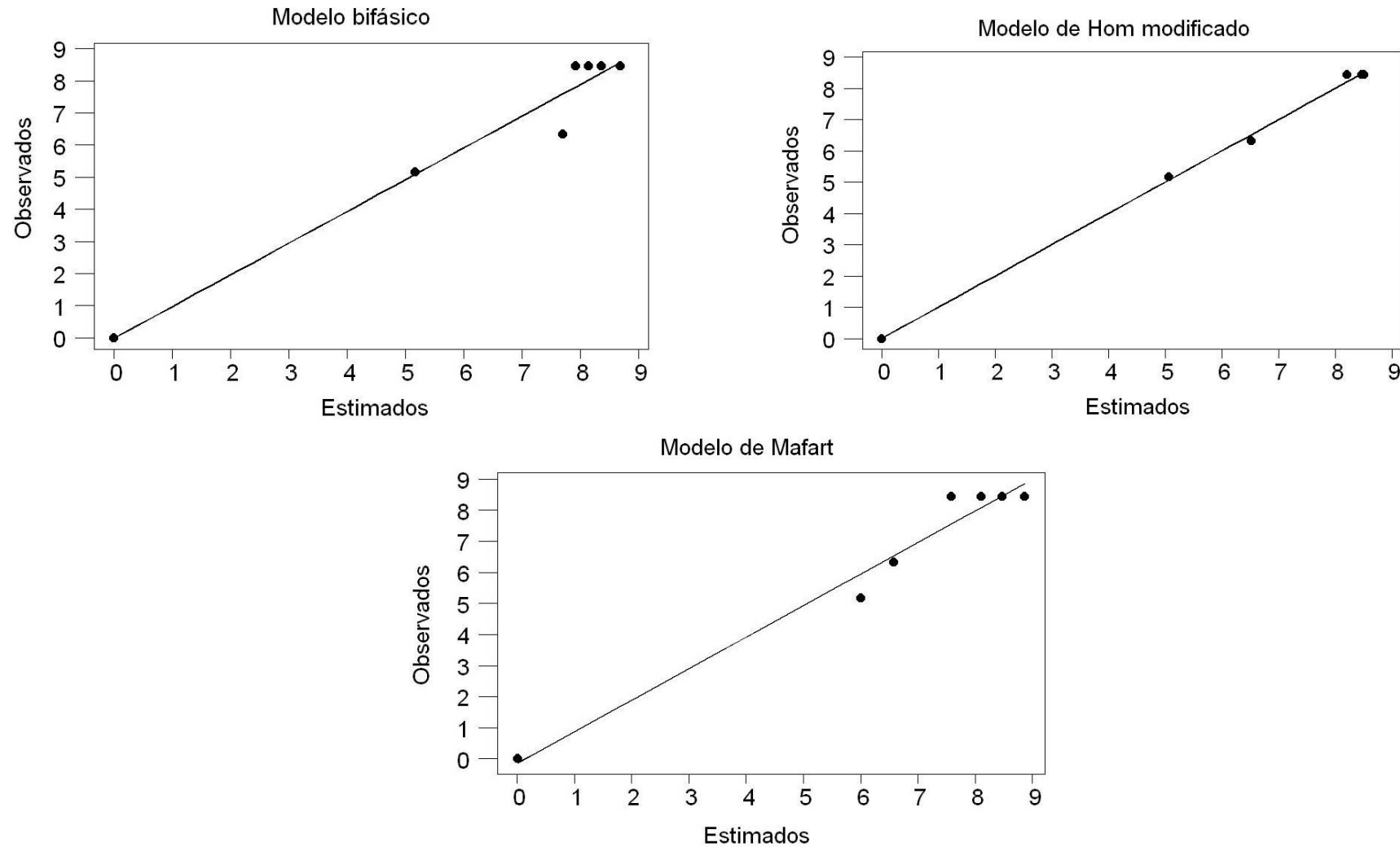


Figura 4.13. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica observada experimentalmente y la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados sobre *Enterococcus* sp. mediante tratamiento de cloración.

#### 4.2.2.6. Estudio económico

La estimación de los costes de un tratamiento es un factor importante a la hora de decidir cuál utilizar en el proceso de potabilización/regeneración a escala real. Para evaluar de manera precisa la rentabilidad coste-efectividad de un tratamiento se deberían tener en cuenta muchos factores como la calidad de agua a tratar, las condiciones y costes de operación, la configuración del reactor, entre otros (*Andreozzi et al.*, 1999; *Murillo et al.*, 2010).

Con la finalidad de estimar los costes del tratamiento de cloración, se van a considerar exclusivamente los costes relativos al agente utilizado. Para poder comparar estos resultados con los obtenidos para el resto de tratamientos estudiados en el presente trabajo de investigación, al ser condiciones de trabajo diferentes para cada tipo de proceso, se calculan los costes derivados del tratamiento que permiten alcanzar una inactivación de una unidad o ciclo logarítmico (90 % de inactivación), para cada una de las formas bacterianas de estudio. Las dosis de cloro necesarias para realizar el cálculo corresponden a las demandas de cloro de cada una de las muestras, pues el nivel de inactivación propuesto se alcanza rápidamente en los primeros segundos del ensayo, por lo que prácticamente no se produce consumo de cloro.

En este proceso, el reactivo implicado es hipoclorito sódico cuyo coste supone 97 €/Tm (con una riqueza del 15%), según la empresa suministradora Ercros, fuente consultada. En la Tabla 4.17 se indican los costes del tratamiento teniendo de referencia los distintos indicadores bacterianos estudiados y a continuación, la expresión utilizada para realizar el cálculo:

$$\text{Dosis cloro (mg /L)} \cdot 10^{-6} \text{ Kg} \cdot \frac{100}{0,15} \cdot \frac{97}{1000} \text{ €/kg}$$

Tabla 4.17. Costes del tratamiento de cloración para la inactivación de un 1 unidad logarítmica sobre *C. perfringens* (células y esporos) y *Enterococcus* sp.

Microorganismo	Coste calculado
Células vegetativas	0,00028 € / m <sup>3</sup>
Esporos	0,00038 € / m <sup>3</sup>
<i>Enterococcus</i> sp.	0,00024 € / m <sup>3</sup>

### 4.2.3. Coagulación, floculación y decantación

#### 4.2.3.1. Procedimiento experimental

Estos ensayos se llevan a cabo sobre muestras fortificadas con células vegetativas de *C. perfringens*.

El experimento se realiza en un Jar Test (OVAN, modelo 6P), dispositivo que consiste en una serie de ejes agitadores de varilla que giran simultáneamente todos a una misma velocidad regulable y constante, permitiendo trabajar con varias muestras (Figura 4.14).

Para que el proceso de coagulación se lleve a cabo, se adiciona como coagulante sulfato de alúmina ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ , Probus). Con el objetivo de optimizar la cantidad de coagulante a adicionar en el ensayo, se preparan cuatro vasos de precipitados con la misma muestra de agua y se añaden 10, 25, 50 y 75 mg  $\text{Al} \cdot \text{L}^{-1}$  de coagulante respectivamente. Tras un periodo inicial de mezcla rápida a 200 r.p.m durante 3 minutos para favorecer la coagulación, se deja flocular 15 minutos con una agitación lenta, 40 r.p.m.

Tras el proceso de coagulación-floculación, las muestras se someten al proceso de decantación. Esta etapa se realiza a escala de laboratorio dejando decantar la muestra un mínimo de 2 horas en un cono Imhoff, cono de vidrio de 46 cm de altura y 11 cm de diámetro (Figura 4.15). Tras finalizar la decantación, se selecciona como dosis óptima de coagulante la que consigue una mayor eliminación de turbidez y un menor volumen de fangos.

Además de analizar la eliminación bacteriana en esta etapa se estudian los parámetros físico-químicos de pH, conductividad y turbidez antes y después del ensayo.

#### 4.2.3.2. Resultados

Todos los resultados físico-químicos y microbiológicos se muestran en la Tabla 4.18.

Esta etapa, por definición, tiene como finalidad eliminar la materia en suspensión presente en el agua. Esta función se pone de manifiesto al reducirse en gran medida los valores de turbidez al final del tratamiento con respecto al inicio. Como se

observa en dicha tabla, se produce una reducción de casi 30 UNT. El resto de parámetros físico-químicos no presentan variaciones significativas.

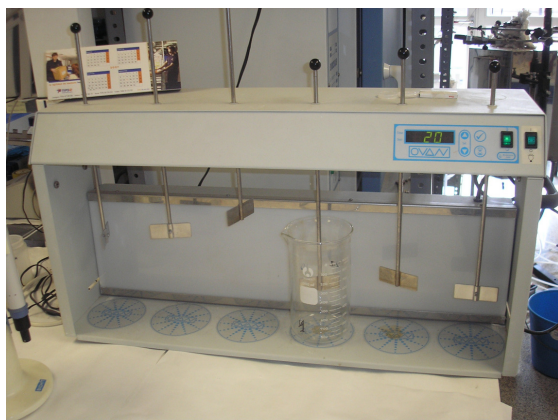


Figura 4.14. Jar Test.



Figura 4.15. Cono Imhoff.

Tabla 4.18. Resultados físico-químicos y microbiológicos en las etapas de coagulación, floculación y decantación.

	Inicial	Final
pH	7,57	7,32
Conductividad ( $\mu\text{s cm}^{-1}$ )	778	799
Turbidez (UNT)	39,05	9,11
<i>C. perfringens</i> (UFC $\cdot 100\text{mL}^{-1}$ )	$3,1 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$

Esta etapa no muestra mucha influencia sobre la desinfección de la muestra ya que se observa sólo una reducción bacteriana de  $0,19 \pm 0,02$  unidades logarítmicas. Este resultado coincide con el obtenido en el análisis realizado a escala real, donde se determina que la etapa de coagulación provoca una reducción de 0,2 unidades, como se recoge en el apartado 4.1.3 del presente capítulo. Ibarz (2008), en sus ensayos de coagulación-floculación y decantación sobre *Enterococcus* sp. obtiene una inactivación ligeramente superior ( $0,5 \pm 0,2$  unidades logarítmicas).

#### 4.2.4. Filtración

##### 4.2.4.1. Procedimiento experimental

El ensayo de filtración se realiza sobre muestras fortificadas con células vegetativas de *C. perfringens*.

Se utiliza un filtro de arena de cristal de 100 cm de altura por 15 cm de diámetro, en cuyo interior se coloca una columna de arena. Ambos materiales se esterilizan previamente para eliminar cualquier tipo de contaminación presente.

La muestra se hace pasar por la columna de arena para simular el recorrido del agua filtrada a escala real. Tras cada experimento, el filtro se limpia mediante el paso de aire y agua a contracorriente y la columna de arena se esteriliza para el siguiente experimento.

##### 4.2.4.2. Resultados

Los parámetros analizados antes y después del ensayo son pH, conductividad, turbidez y recuento de *C. perfringens*, mostrándose los resultados en la Tabla 4.19.

Tabla 4.19. Resultados físico-químicos y microbiológicos en la etapa de filtración.

	Inicial	Final
pH	7,16	7,57
Conductividad ( $\mu\text{s cm}^{-1}$ )	1.567	1.590
Turbidez (UNT)	22,64	10,82
<i>C. perfringens</i> (UFC 100mL <sup>-1</sup> )	$8,7 \cdot 10^6$	$4,2 \cdot 10^5$

Respecto a los parámetros físico-químicos, la mayor variación se observa en la turbidez, cuyo valor se reduce a la mitad. La finalidad de esta etapa es eliminar la materia particulada que no ha sedimentado en la etapa previa de decantación y así obtener un agua totalmente clarificada.

A nivel microbiológico, se produce una reducción bacteriana de  $1,32 \pm 0,2$  unidades logarítmicas. Por tanto, se deriva que los microorganismos se quedan retenidos entre los granos del lecho de arena, transfiriéndose la contaminación del agua al filtro, ya que esta etapa es meramente física. Este resultado no se puede

comparar con el obtenido a escala real ya que en este caso, la carga microbiológica del agua cuando llega a esta etapa es nula, consiguiéndose la desinfección completa en las etapas previas de cloración y coagulación.

Hijnen (2004) realizó experimentos con el fin de estudiar la capacidad de eliminación de virus, bacterias y ooquistes de protozoos en la etapa de filtración por arena y obtuvo que el mecanismo más significativo implicado en la eliminación de virus es la adsorción, en el caso de los esporos de *C. perfringens* y *E. coli* interviene la adsorción y la presión física, mientras que para los ooquistes de *Cryptosporidium*, la presión física es el principal mecanismo de eliminación. Ibarz (2008) no observa una eliminación eficaz de *Enterococcus* sp. en la operación de filtración, alcanzando una reducción de 0,1 unidad logarítmica. Esta diferencia con respecto a *C. perfringens* puede ser debido al diferente tamaño y forma de ambas especies. Las formas vegetativas de *C. perfringens* son bacilos de 0,9-1,3  $\mu\text{m}$  de ancho por 3 -9  $\mu\text{m}$  de largo, lo que supone un mayor tamaño y volumen con respecto a *Enterococcus* sp., cocos de 0,5 - 1  $\mu\text{m}$  de diámetro (Madigan et al., 2003). Es probable que los cocos, por su forma esférica, pasen más fácilmente entre las partículas de arena, siendo arrastradas por la corriente de agua que los bacilos, que al ser alargados, pueden quedarse atrapados con más facilidad entre los recovecos que quedan entre dichas partículas.

Independientemente del tipo de mecanismo implicado en la inactivación de los microorganismos patógenos es importante, como de hecho se hace en las líneas de tratamiento a escala real, que el agua de lavado de los filtros se recircule a cabecera de planta para ser tratada de nuevo ya que potencialmente, podría poseer una carga microbiológica elevada si no estuviese correctamente desinfectada, tal y como se observa en este apartado.

#### **4.2.5. Adsorción con carbón activo**

##### **4.2.5.1. Procedimiento experimental**

En esta etapa se utiliza carbón activado en polvo de origen vegetal, fabricado a partir de madera (ChiemiVall V Plus). Está activado con vapor y cumple con la norma EN 12903 para su uso en tratamientos de agua potables. Sus características se muestran en la Tabla 4.20.



El objetivo de este ensayo es estudiar la capacidad de adhesión de los microorganismos a los granos de carbón para evaluar el grado de participación de esta etapa en el fenómeno de desinfección.

Tabla 4.20. Características del carbón activo en polvo ChiemiVall V Plus.

Especificaciones	Valor típico
Área superficial	1.000 m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>
Número de yodo	950 mg g <sup>-1</sup>
Contenido en cenizas	3 %
pH del extracto acuoso	9 – 10
Tamaño de partícula	< 0,044 mm el 90%

Este ensayo se realiza también sobre muestras fortificadas con células vegetativas de *C. perfringens*. Se utiliza una concentración de carbón de 10 mg L<sup>-1</sup>, dosis habitualmente utilizada en las ETAPs. La muestra se agita a 100 r.p.m durante 10 minutos, tomando muestras antes y después del ensayo.

#### 4.2.5.2. Resultados

Antes y después del tratamiento se miden los parámetros de pH, conductividad, turbidez e inactivación bacteriana, cuyos resultados se visualizan en la Tabla 4.21.

Tabla 4.21. Resultados físico-químicos y microbiológicos en la etapa de adsorción.

	Inicial	Final
pH	7,16	7,82
Conductividad (µs cm <sup>-1</sup> )	1.567	1.620
Turbidez (UNT)	22,64	22,67
<i>C. perfringens</i> (UFC 100mL <sup>-1</sup> )	8,7 ·10 <sup>6</sup>	4,3 ·10 <sup>6</sup>

No se detecta ninguna variación importante en los parámetros físico-químicos analizados. La inactivación bacteriana alcanzada al final del tratamiento es de 0,3 ± 0,1

unidades logarítmicas, coincidiendo con la inactivación obtenida por Ibarz (2008) sobre *Enterococcus* sp. Este resultado es similar al obtenido en la planta a escala real (Tabla 4.4) donde esta etapa no mostraba prácticamente influencia sobre la reducción bacteriana. Por tanto, la influencia de esta etapa en la eliminación bacteriana es reducida bajo las condiciones de estudio aplicadas, en relación al nivel de desinfección obtenido en otras etapas.



## Capítulo 5.

Eliminación de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp.  
mediante POAs basados en irradiación UV/VIS

---



## 5.1. Procedimiento experimental

### 5.1.1. Muestras

#### 5.1.1.1. Muestras de agua natural fortificadas con *Enterococcus* sp.

Las muestras de agua natural fortificadas con *Enterococcus* sp. se preparan siguiendo la metodología mostrada en el capítulo 4, apartado 4.2.1.2 de la presente memoria. La concentración bacteriana inicial en las muestras es alrededor de  $10^8$  UFC·100 mL<sup>-1</sup>.

#### 5.1.1.2. Muestras de agua natural fortificadas con células vegetativas de *C. perfringens*

Las muestras de agua natural fortificadas con células vegetativas se preparan siguiendo la metodología mostrada en el capítulo 4, apartado 4.2.1.2 de la presente memoria. La concentración inicial de células vegetativas en las muestras asciende a  $10^7$ - $10^8$  UFC·100 mL<sup>-1</sup>.

#### 5.1.1.3. Muestras de agua natural fortificadas con esporos de *C. perfringens*

Las muestras de agua natural fortificadas con esporos se preparan siguiendo la metodología mostrada en el capítulo 4, apartado 4.2.1.2 de la presente memoria. La concentración inicial de esporos en las muestras asciende a  $10^3$  UFC·100 mL<sup>-1</sup>.

### 5.1.2. Agentes utilizados en los tratamientos

#### 5.1.2.1. Irradiación UV/VIS

La irradiación utilizada en los tratamientos de esta parte de la experimentación se simula con una cámara solar Atlas Suntest CPS+/XLS+ mediante una lámpara de xenon, cuyo intervalo de intensidad se sitúa entre 250-765 W m<sup>-2</sup> (Figura 5.1). Mediante dos filtros que cubren la lámpara de xenon, un filtro de cuarzo y un filtro adicional de ventana (Xenochrome 320), se consigue la emisión de los dos rangos de irradiación que son utilizados en los tratamientos de desinfección:

1. *Rango 290-800 nm*: comprende las radiaciones UVB, UVA y visible. El filtro de cuarzo con una capa selectiva de reflexión intercepta la radiación de infrarrojo. Este rango representa la radiación solar que incide al aire libre.

En la Figura 5.2 se muestra comparativamente el espectro solar simulado y el natural.

2. *Rango 320-800 nm*: comprende las radiaciones UVA y visible. Además del filtro de cuarzo, se coloca un filtro adicional de cristal de ventana de 6 mm (Filtro “ID 65”) que intercepta las longitudes de onda por debajo de los 320 nm, eliminando el rango UVB.



Figura 5.1. Cámara solar utilizada.

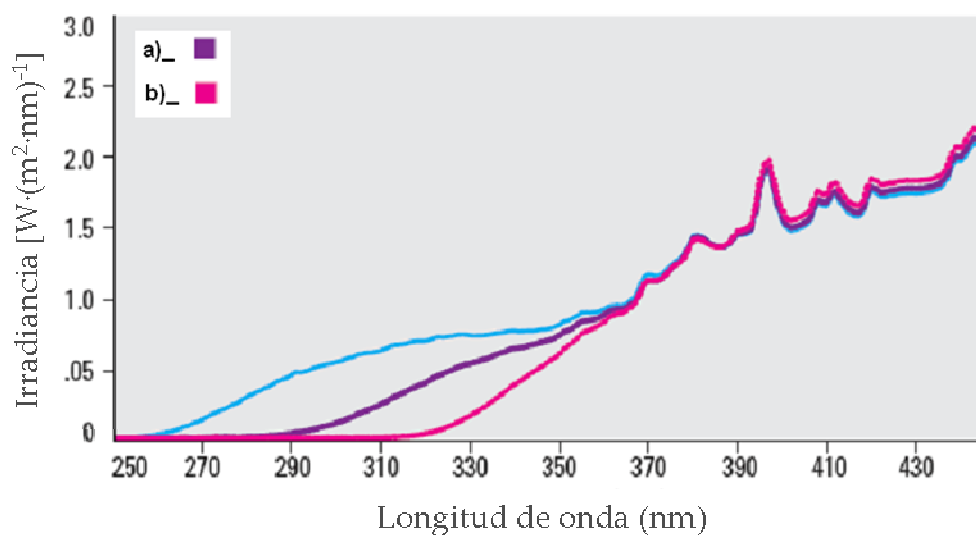


Figura 5.2. Radiometría de la luz solar y lámpara de xenon con y sin filtro de ventana. Espectro solar simulado y natural; (a) sin filtro de ventana, (b) con filtro de “vidrio de ventana” (Miguel, 2010).

Las muestras que son tratadas se colocan en el interior de la cámara solar. Con un agitador magnético, se proporciona a la muestra un medio aireado y una mezcla

perfecta durante los experimentos. La cámara también está equipada con un regulador de intensidad y de tiempo de exposición, además de un control de temperatura. La intensidad de la irradiación seleccionada para todos los experimentos es de  $500 \text{ W m}^{-2}$ , que corresponde al 50% de la intensidad de la radiación solar natural al medio día y es utilizada por diversos autores en sus estudios (*Yuranova et al., 2004; Gummy et al., 2006*).

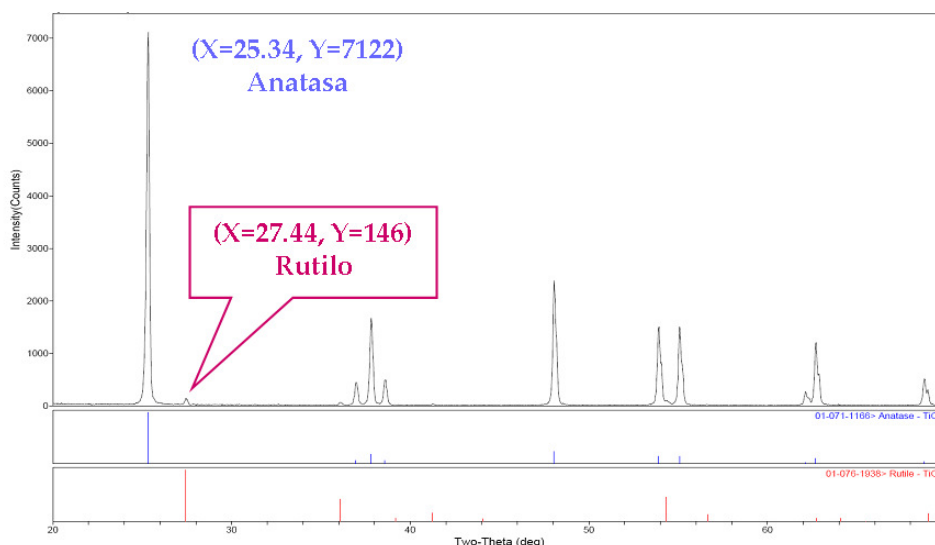
#### 5.1.2.2. Dióxido de titanio

El catalizador utilizado en los experimentos se prepara a partir de  $\text{TiO}_2$  comercial (>98% anatasa, Panreac). En la literatura se establece que el  $\text{TiO}_2$ , en la fase cristal de anatasa, exhibe la mayor fotoactividad (*Mahltig et al., 2011*).

Con el objeto de mejorar sus propiedades mecánicas, el catalizador comercial se somete a un tratamiento térmico de  $900^\circ\text{C}$  durante 12h. Después de enfriar el  $\text{TiO}_2$  a temperatura ambiente y con la finalidad de obtener un tamaño de partícula homogéneo, el  $\text{TiO}_2$  se compacta en una prensa hidráulica hasta alcanzar una presión de  $10 \text{ T}\cdot\text{cm}^{-2}$  de manera que se obtienen unas pastillas que posteriormente se tamizan, dando lugar a partículas de 0,5 mm de diámetro. Este proceso permite obtener un catalizador con una adecuada velocidad de sedimentación ( $0,4 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ ), facilitando su posterior eliminación por sedimentación (*Canche, 2007; Miguel, 2010*). Fernández (2003) demuestra en su investigación que más de un 97% de partículas pueden ser recuperadas a partir de una suspensión con  $\text{TiO}_2$ .

Posteriormente, el catalizador se caracteriza estructural y texturalmente. Se caracteriza mediante los métodos BET (Brunauer, Emmett and Teller) y XRD, detallados en el apartado 3.1 de la presente memoria. El área específica conseguida es  $6,43 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ . Su espectro DRX se muestra en la Figura 5.3, en la que se observa que la fase predominante es la anatasa, más específicamente 80 % anatasa y 20 % rutilo. Esta relación se considera por algunos autores adecuada para la fotocatalisis heterogénea (*Rincón y Pulgarín, 2003*). Mahltig (2011) indica que las propiedades fotocatalíticas del  $\text{TiO}_2$  pueden ser mejoradas si además de anatasa está presente cierta cantidad de otra fase cristalina del  $\text{TiO}_2$ , en concreto de rutilo. Otros autores, como Rju y Choi (2008), defienden que la creencia de que la anatasa es más fotoactiva que el rutilo no siempre puede ser apoyada bajo ciertas condiciones de trabajo.



Figura 5.3. Difractograma del TiO<sub>2</sub>.

### 5.1.2.3. Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno comercial utilizado en los experimentos basados en irradiación es de la marca Carlo Erba y tiene una concentración del 30% (v/v).

## 5.2. Condiciones de operación, resultados e interpretación

### 5.2.1. Inactivación de células vegetativas y esporos de *C. perfringens*

#### 5.2.1.1. Condiciones de operación

La duración máxima de los experimentos de irradiación, irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fotocátalisis y fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es de 5 minutos para las muestras fortificadas con células vegetativas de *C. perfringens* y de 30 minutos para los esporos.

El rango de trabajo utilizado corresponde al intervalo 320-800 nm, comprendiendo los rangos UVA y visible del espectro solar, a través del uso conjunto del filtro de cuarzo y el filtro de ventana.

Los experimentos se realizan a temperatura ambiente (23°C) y las temperaturas máximas que se alcanzan durante los tratamientos son 29-30°C. Está bien establecido que parte de la inactivación bacteriana en estudios de desinfección solar se debe a un incremento en la temperatura de las muestras (40-45°C) (McGuigan *et al.*, 1998); sin embargo, la temperatura más alta alcanzada en los experimentos realizados en el

presente estudio es muy inferior, siendo el grado de desinfección atribuido a este factor despreciable.

En los tratamientos en los que participa el catalizador  $\text{TiO}_2$ , para favorecer una mezcla perfecta de la muestra en el reactor, se introduce un imán magnético que evita que el  $\text{TiO}_2$  se deposite en el fondo durante el experimento. La concentración de  $\text{TiO}_2$  utilizada en los tratamientos en los que participa es de  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , tal y como aconsejan muchos autores en tratamientos de fotocátalisis (Rincón y Pulgarín, 2003, 2004c; Cho *et al.*, 2004; Gummy *et al.*, 2006; Ibarz, 2008). Concentraciones muy elevadas del catalizador pueden dar como resultado la saturación del medio y con ello, una menor efectividad en la desinfección con radiación solar, ya que la luz no puede penetrar fácilmente en el agua y tanto la actividad del catalizador como la acción directa de la luz ven disminuidos su efecto. Maness (1999) obtiene como concentración más efectiva de  $\text{TiO}_2$  para la eliminación de *E. coli*, mediante fotocátalisis, el valor de  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , entre otras concentraciones inferiores ( $0,1$  y  $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), partiendo de poblaciones iniciales entre  $10^3$  y  $10^8 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Ibarz (2008) observa un aumento proporcional en la desactivación de *Enterococcus* sp. hasta llegar a una concentración de  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , a partir de la cual el nivel de desinfección alcanzado se mantiene constante.

A lo largo del desarrollo de los experimentos, se toman muestras a diferentes intervalos de tiempo con el fin de evaluar el efecto de los tratamientos sobre las dos formas poblacionales objeto de estudio. En las muestras provenientes de los tratamientos en los que participa el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , cuya dosis inicial es  $0,04 \text{ mM}$  ( $1,365 \text{ mg H}_2\text{O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ), su dosis residual se neutraliza con tiosulfato sódico con el objeto de anular su efecto bactericida.

#### 5.2.1.2. Resultados del tratamiento de irradiación

La Tabla 5.1 muestra los recuentos bacterianos obtenidos durante del proceso de irradiación y en oscuridad, poniéndose de manifiesto la ausencia de desinfección en este último caso. Las poblaciones que sobreviven a la irradiación también son elevadas tanto a nivel vegetativo, como a nivel de esporos.

Las Figuras 5.4 y 5.5 representan las curvas de inactivación de las células vegetativas y esporos, respectivamente, a lo largo del tratamiento de irradiación. En

dicha gráfica la inactivación en unidades logarítmicas se representa vs. tiempo, en minutos.

Tabla 5.1. Recuentos de células vegetativas y esporos de *C. perfringens* (UFC·100mL<sup>-1</sup>) durante los tratamientos de oscuridad e irradiación ( $\lambda$ : 320-800 nm) sobre la muestra natural.

Forma celular	Tratamiento	Recuento	0'	0,5'	1'	2'	3'	5'
Células vegetativas	Oscuridad	N <sub>t</sub>	7,8·10 <sup>8</sup>					6,2·10 <sup>8</sup>
	Irradiación	N <sub>t</sub>	7,7·10 <sup>8</sup>	4,9·10 <sup>8</sup>	3,4·10 <sup>8</sup>	2,1·10 <sup>8</sup>	8,4·10 <sup>7</sup>	4,9·10 <sup>7</sup>

Forma celular	Tratamiento	Recuento	0'	5'	10'	20'	30'
Esporos	Oscuridad	N <sub>t</sub>	2,6·10 <sup>3</sup>				3,1·10 <sup>3</sup>
	Irradiación	N <sub>t</sub>	5,9·10 <sup>3</sup>	5,7·10 <sup>3</sup>	5,5·10 <sup>3</sup>	4,6·10 <sup>3</sup>	3,8·10 <sup>3</sup>

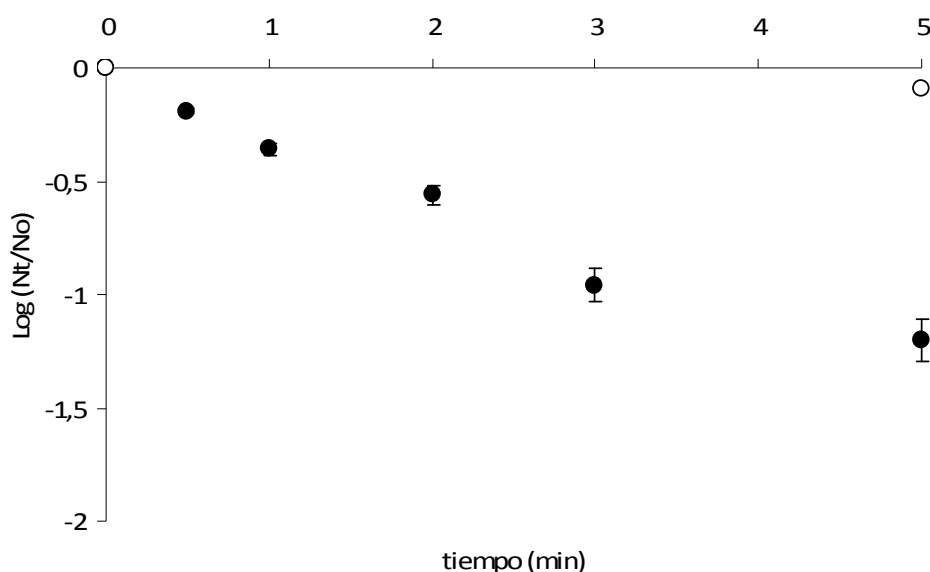


Figura 5.4. Inactivación de las células vegetativas de *C. perfringens* en oscuridad (○) y en el tratamiento de irradiación (●) sobre la muestra natural.  $\lambda$ =320-800 nm.  $N_0$  =7,7·10<sup>8</sup> UFC· 100 mL<sup>-1</sup>

Se observa una mayor pendiente de inactivación sobre la población de células vegetativas que sobre los esporos.

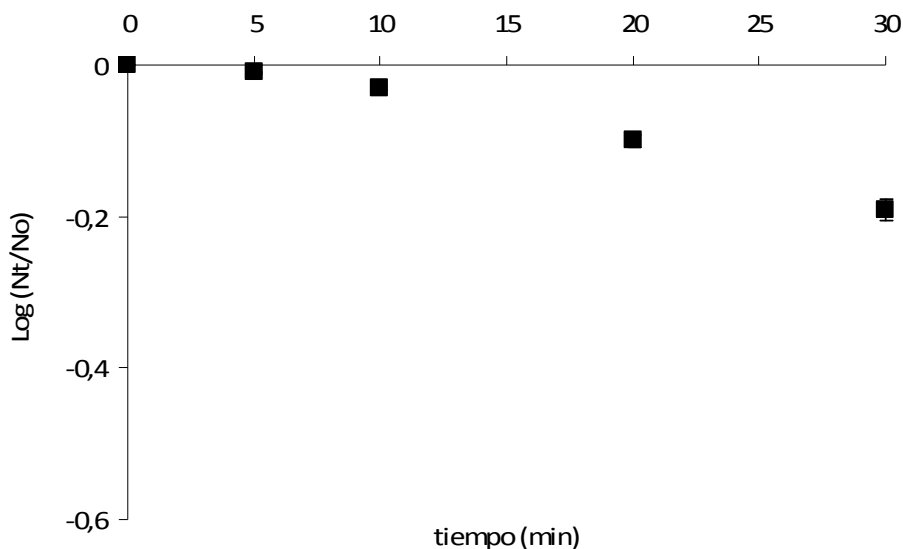


Figura 5.5. Inactivación de esporos de *C. perfringens* en el tratamiento de irradiación sobre la muestra natural.  $\lambda=320-800$  nm.  $N_0 = 5,9 \cdot 10^3$  UFC  $\cdot$  100 mL<sup>-1</sup>.

Sobre las células vegetativas, se obtiene una reducción poblacional de  $1,2 \pm 0,09$  unidades logarítmicas al final del experimento, mientras que en el caso de los esporos, el tratamiento prácticamente no les afecta, incluso después de 30 minutos de tratamiento. Se alcanza finalmente una inactivación de  $0,2 \pm 0,01$  unidades logarítmicas.

La escasa inactivación obtenida sobre las formas esporuladas es también observada por otros autores. Mamane (2007) tampoco obtiene inactivación sobre los esporos de *Bacillus subtilis* tras un tratamiento de radiación UVB y UVA (295-400 nm) de 15 minutos. Riesenman y Nicholson (2000) demuestran una mayor sensibilidad de los esporos a la radiación UVC. Finalmente, Dunlop (2008) consigue alcanzar una inactivación de esporos de *C. perfringens* cercana al 60% después de 120 minutos mediante un tratamiento de radiación UVA con aire. En consecuencia, se evidencia que son necesarios largos periodos de exposición para conseguir una inactivación completa de las formas esporuladas.

#### 5.2.1.3. Resultados del tratamiento de fotocátalisis

Las poblaciones supervivientes de células vegetativas y esporos a lo largo de los tratamientos de TiO<sub>2</sub> y fotocátalisis (TiO<sub>2</sub> + irradiación con  $\lambda$  320-800 nm) se muestran en la Tabla 5.2. En ausencia de irradiación, el efecto del catalizador es prácticamente nulo sobre las dos formas poblacionales de *C. perfringens*, tal y como también observan

otros autores, sobre poblaciones de *E. coli* (Rincón y Pulgarin, 2003, 2004 a,c; Robertson et al., 2005).

Tabla 5.2. Recuentos de células vegetativas y esporos de *C. perfringens* (UFC·100mL<sup>-1</sup>) durante los tratamientos de TiO<sub>2</sub> y fotocátalisis ( $\lambda$ : 320-800 nm) sobre la muestra natural.

Forma celular	Tratamiento	Recuento	0'	0,5'	1'	2'	3'	5'
Células vegetativas	TiO <sub>2</sub>	N <sub>t</sub>	7,8·10 <sup>8</sup>	5,9·10 <sup>8</sup>	4,8·10 <sup>8</sup>	3,5·10 <sup>8</sup>	2,4·10 <sup>8</sup>	1,5·10 <sup>8</sup>
	Fotocátalisis	N <sub>t</sub>	5·10 <sup>8</sup>	1,8·10 <sup>8</sup>	1,7·10 <sup>7</sup>	1,6·10 <sup>5</sup>	3,1·10 <sup>4</sup>	6,2·10 <sup>2</sup>

Forma celular	Tratamiento	Recuento	0'	5'	10'	20'	30'
Esporos	TiO <sub>2</sub>	N <sub>t</sub>	2,6·10 <sup>3</sup>				2,5·10 <sup>3</sup>
	Fotocátalisis	N <sub>t</sub>	3,3·10 <sup>3</sup>	8·10 <sup>2</sup>	6,5·10 <sup>2</sup>	4,4·10 <sup>2</sup>	1,6·10 <sup>2</sup>

En la Figura 5.6 se representa la curva de inactivación de las células vegetativas en respuesta al tratamiento fotocatalítico y en la Figura 5.7, la de esporos. Cuando el TiO<sub>2</sub> se activa con la presencia de radiación solar, se consigue alcanzar un nivel de inactivación sobre las células vegetativas de  $5,9 \pm 0,4$  unidades logarítmicas, cinco veces superior al nivel alcanzado con la luz por si sola. En términos estadísticos, existen diferencias muy significativas entre el tratamiento de fotocátalisis y el tratamiento de irradiación ( $p < 0,01$ ).

Respecto a los esporos, Figura 5.7, cuando el dióxido de titanio se suma a la radiación solar, también mejora la capacidad de desinfección sobre la muestra. Después de 30 minutos de tratamiento, la reducción de esporos se traduce en  $1,3 \pm 0,1$  unidades logarítmicas, prácticamente una unidad de inactivación mayor sobre el resultado obtenido con el tratamiento de irradiación. A nivel estadístico, se observan diferencias altamente significativas entre la fotocátalisis y el tratamiento de irradiación ( $p < 0,001$ ).

A los 5 minutos de tratamiento, que supone el fin de tratamiento para las células vegetativas, la eliminación de esporos observada es inferior a 1 unidad logarítmica. Se pone de manifiesto que los esporos, como formas de resistencia

desarrolladas ante las condiciones adversas del medio, presentan una resistencia mayor a los tratamientos de desinfección que sus formas celulares o vegetativas.

Se vuelve a observar una pendiente mayor de inactivación sobre la población de células vegetativas que sobre los esporos, lo que conlleva una reducción más rápida en el primer caso.

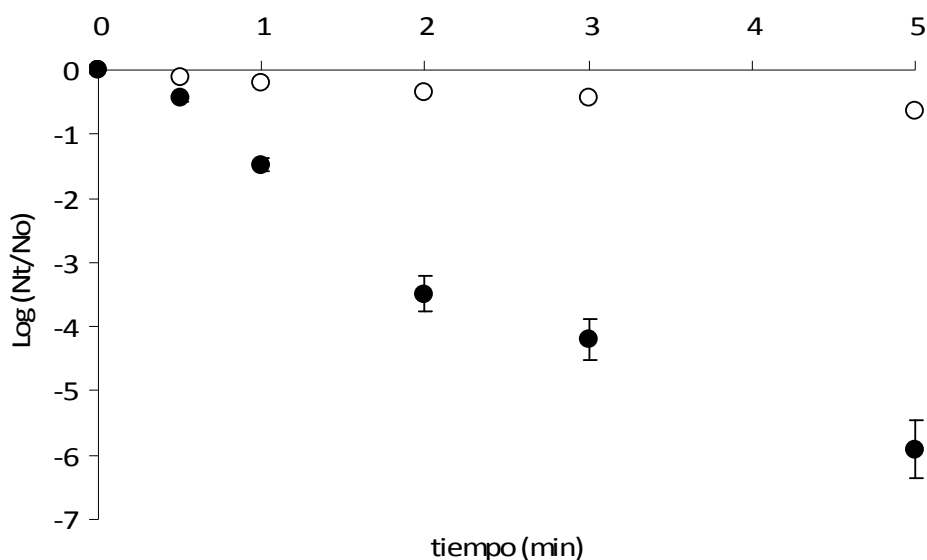


Figura 5.6. Inactivación de las células vegetativas de *C. perfringens* en el tratamiento de TiO<sub>2</sub> (○) y fotocátalisis (●) sobre la muestra natural.  $\lambda=320-800$  nm.  $N_0=5 \cdot 10^8$  UFC  $\cdot$  100 mL<sup>-1</sup>. [TiO<sub>2</sub>]=1 g L<sup>-1</sup>.

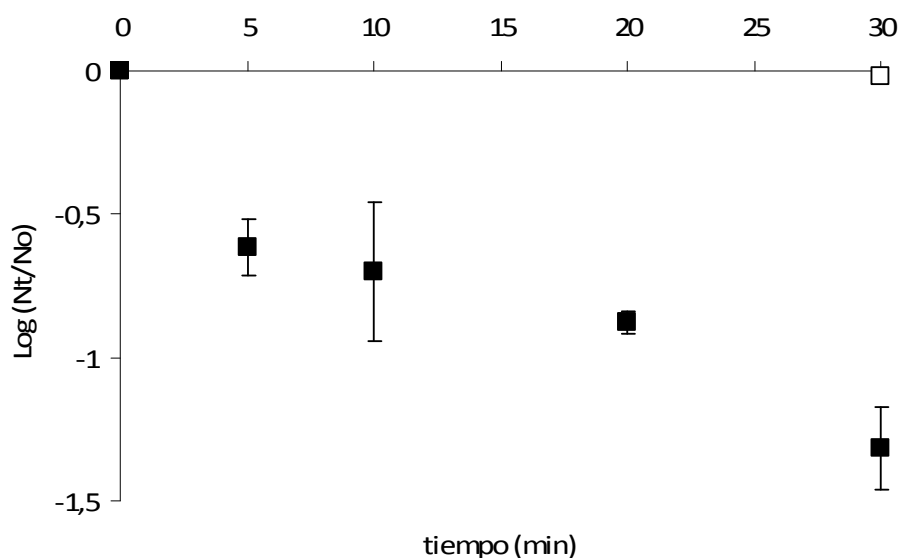


Figura 5.7. Inactivación de esporos de *C. perfringens* en el tratamiento de TiO<sub>2</sub> (□) y fotocátalisis (■) sobre la muestra natural.  $\lambda=320-800$  nm.  $N_0=3,3 \cdot 10^3$  UFC  $\cdot$  100 mL<sup>-1</sup>. [TiO<sub>2</sub>]=1 g L<sup>-1</sup>.

En el rango de irradiación aplicado (>320nm), se detecta claramente que la luz, por si sola, tiene un pobre efecto desinfectante sobre *C. perfringens*. Sin embargo, la actuación conjunta del TiO<sub>2</sub> y la irradiación produce una mejora esencial en la desinfección ya que el TiO<sub>2</sub> se activa a longitudes de onda inferiores a 385 nm, generándose en su superficie precursores de radicales OH, entre otros ROS, que aumentan el estrés existente sobre las bacterias. Guimarães y Barretto (2003) reflejan este mismo comportamiento sobre esporos de *C. perfringens* sometidos a un tratamiento de fotocátalisis con TiO<sub>2</sub> inmovilizado, a partir de muestras de agua natural con distintos valores de turbidez y color. Rincón y Pulgarin (2003) establecen que la generación de una mayor cantidad de radicales ROS en el tratamiento de fotocátalisis excede los mecanismos de protección que inicialmente desarrollan las células para combatir la agresión, deteriorándose más rápidamente. Ibáñez (2003) logra inactivar *Enterobacter cloacae* con el sistema UV/TiO<sub>2</sub>, tras no poder eliminar sus resistentes poblaciones en ausencia de TiO<sub>2</sub>.

#### 5.2.1.4. Resultados del tratamiento de irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

La Tabla 5.3 muestra los recuentos bacterianos obtenidos durante los tratamientos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La Figura 5.8 representa el efecto desinfectante que la combinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e irradiación ejerce sobre la población de células vegetativas y en la Figura 5.9, sobre los esporos de *C. perfringens*.

Tabla 5.3. Recuentos de células vegetativas y esporos de *C. perfringens* (UFC·100mL<sup>-1</sup>) durante los tratamientos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (λ: 320-800 nm) sobre la muestra natural.

Forma celular	Tratamiento	Recuento	0'	0,5'	1'	2'	3'	5'
Células vegetativas	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	N <sub>t</sub>	7,8·10 <sup>8</sup>	4,3·10 <sup>8</sup>	2,2·10 <sup>8</sup>	3,5·10 <sup>8</sup>	2,7·10 <sup>8</sup>	1,9·10 <sup>7</sup>
	Irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	N <sub>t</sub>	7,2·10 <sup>8</sup>	3,6·10 <sup>5</sup>	1,1·10 <sup>5</sup>	4,1·10 <sup>2</sup>	5,4·10 <sup>1</sup>	3,0·10 <sup>0</sup>

Forma celular	Tratamiento	Recuento	0'	5'	10'	20'	30'
Esporos	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	N <sub>t</sub>	2,6·10 <sup>3</sup>		1,3·10 <sup>3</sup>	9,4·10 <sup>2</sup>	7·10 <sup>2</sup>
	Irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	N <sub>t</sub>	2,3·10 <sup>3</sup>	2,1·10 <sup>2</sup>	1,4·10 <sup>2</sup>	1,4·10 <sup>2</sup>	1,7·10 <sup>2</sup>

El  $\text{H}_2\text{O}_2$ , por si solo, a la concentración utilizada (0,04 mM) tiene un ligero efecto bactericida derivado de su acción directa molecular. Sin embargo, la combinación de ambos agentes incrementa la capacidad desinfectante de los tratamientos por separado. En la Tabla 5.3 y gráficamente en la Figura 5.8 se observa que el tratamiento irradiación/ $\text{H}_2\text{O}_2$  obtiene la desinfección completa de la muestra con células vegetativas al finalizar el ensayo, con valores de inactivación que alcanzan las  $8,4 \pm 0,6$  unidades logarítmicas.

Respecto a la efectividad de este tratamiento sobre los esporos, Figura 5.9, el mayor grado de inactivación se consigue durante los primeros 5-10 minutos de experimento. Posteriormente, la población de esporos permanece prácticamente estable en el tiempo hasta finalizarse el tratamiento, detectándose un resultado final de  $1,1 \pm 0,08$  unidades logarítmicas, a pesar de que se mantiene en el medio una concentración residual de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 0,5-2 mg L<sup>-1</sup>.

La pendiente de la curva de inactivación de las células vegetativas vuelve a ser más pronunciada que respecto a la de los esporos.

Este tratamiento obtiene mejores resultados que los conseguidos por los tratamientos de irradiación y fotocátalisis sobre las formas vegetativas de *C. perfringens*. En términos estadísticos, existen diferencias altamente significativas entre el tratamiento de irradiación/ $\text{H}_2\text{O}_2$  y de irradiación ( $p < 0,001$ ) y diferencias significativas entre el tratamiento de irradiación/ $\text{H}_2\text{O}_2$  y la fotocátalisis ( $p < 0,05$ ).

En el caso de los esporos, la fotocátalisis obtiene un resultado ligeramente mayor al alcanzado por la irradiación/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , si bien la pendiente de inactivación es mayor en este último proceso. Estadísticamente, existen diferencias muy significativas entre el tratamiento de irradiación/ $\text{H}_2\text{O}_2$  y de irradiación ( $p < 0,01$ ), pero no se observan diferencias significativas entre el sistema irradiación/ $\text{H}_2\text{O}_2$  y la fotocátalisis.

En este tratamiento, el efecto conjunto de la acción desinfectante del peróxido de hidrógeno y la acción directa de la luz sobre las bacterias y sobre las moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se traduce en la formación, por diversas vías, de una importante cantidad de radicales OH, entre otros ROS, que actúan directamente sobre las bacterias favoreciendo su eliminación.



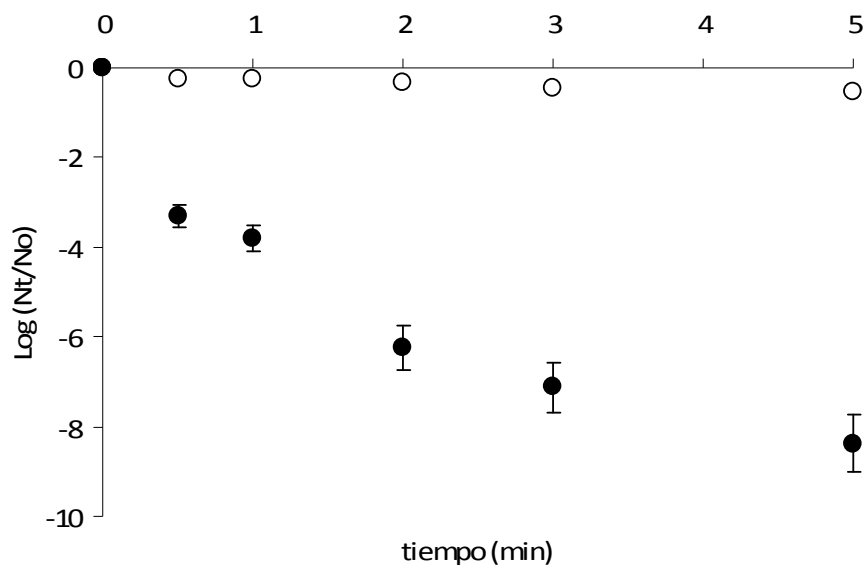


Figura 5.8. Inactivación de células vegetativas de *C. perfringens* en el tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (○) e irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (●) sobre la muestra natural.  $\lambda=320-800$  nm.  $N_0=7,2 \cdot 10^8$  UFC  $\cdot 100$  mL<sup>-1</sup>. [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=0,04 mM.

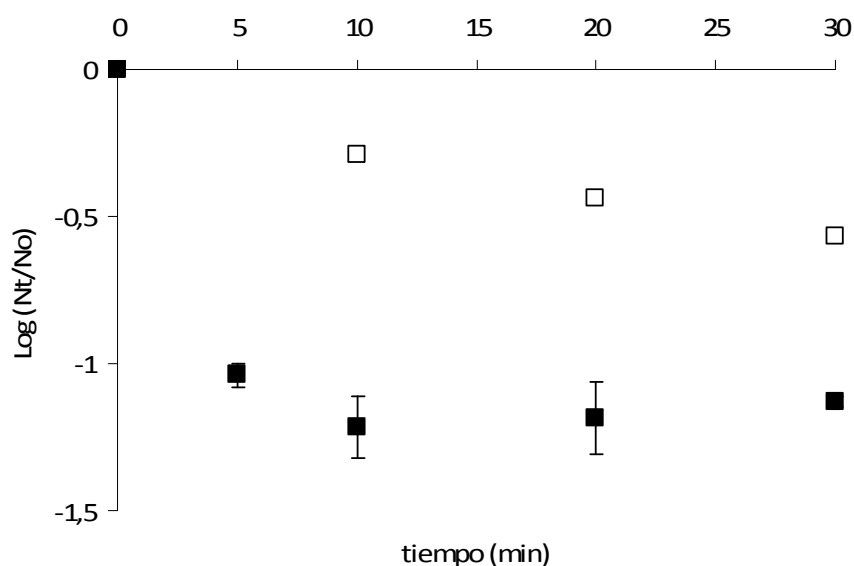


Figura 5.9. Inactivación de esporos de *C. perfringens* en el tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (□) e irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (■) sobre la muestra natural.  $\lambda=320-800$  nm.  $N_0=2,3 \cdot 10^3$  UFC  $\cdot 100$  mL<sup>-1</sup>. [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=0,04 mM.

En esta línea, Mamane (2007) no observa en sus experimentos de radiación UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\lambda$  295-400nm, 10-25 mg L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ninguna inactivación sobre esporos de *B. subtilis*, a pesar de utilizar dosis de peróxido superiores a las utilizadas en estos ensayos. Riesenman y Nicholson (2000) indican que los esporos de *B. subtilis* son resistentes al peróxido de hidrógeno porque la cubierta del mismo actúa como una

barrera que evita la difusión del peróxido hacia su interior o bien, que las proteínas estructurales de dicha cubierta lo oxidan antes de que este oxidante alcance el núcleo del esporo.

Rincón y Pulgarin (2004c) establecen, tras sus estudios fotocatalíticos sobre *E. coli*, un efecto de sinergia entre el peróxido y la radiación solar. La acción directa del  $H_2O_2$  debilita las bacterias, haciéndolas más sensibles al efecto de la radiación solar, mientras que a su vez, la radiación también debilita a las bacterias, haciéndolas más sensibles al ataque del peróxido de hidrógeno. Hartmann (1978) obtuvo inactivaciones de *E. coli* en torno a 2 unidades logarítmicas con radiación UVA (300-400 nm) y pequeñas cantidades de  $H_2O_2$  (0,006 a 0,6 mM).

#### 5.2.1.5. Resultados del tratamiento de fotocátalisis/ $H_2O_2$

La Tabla 5.4 muestra los recuentos de las poblaciones de células y esporos obtenidos durante los tratamientos de  $H_2O_2/TiO_2$  y fotocátalisis/ $H_2O_2$ . Las Figuras 5.10 y 5.11 representan las curvas de inactivación de las células vegetativas y los esporos de *C. perfringens*, respectivamente, durante dichos procesos.

La combinación de  $H_2O_2$  con  $TiO_2$ , en ausencia de luz, muestra ligeramente un efecto desinfectante sobre ambas formas bacterias. Este efecto responde a la acción del peróxido, como se ha observado también en las Figuras 5.8 y 5.9, correspondientes al tratamiento anterior.

Sin embargo, cuando la luz participa en el proceso, la capacidad desinfectante de los agentes implicados se incrementa en gran medida, alcanzando un nivel de inactivación sobre las células vegetativas de  $6,9 \pm 0,5$  unidades logarítmicas tras los 5 minutos de tratamiento (Figura 5.10). Este resultado es ligeramente inferior al obtenido con el tratamiento de irradiación/ $H_2O_2$  (Figura 5.9), ligeramente superior al obtenido con la fotocátalisis y muy superior al alcanzado por la irradiación en solitario (Figura 5.6). Estadísticamente hablando, sólo existen diferencias muy significativas entre el tratamiento fotocátalisis/ $H_2O_2$  y el tratamiento de irradiación ( $p < 0,01$ ).

Tabla 5.4. Recuentos de células vegetativas y esporos de *C. perfringens* (UFC·100mL<sup>-1</sup>) durante los tratamientos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> y fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\lambda$ : 320-800 nm) sobre la muestra natural.

Forma celular	Tratamiento	Recuento	0'	0,5'	1'	2'	3'	5'
Células vegetativas	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /TiO <sub>2</sub>	N <sub>t</sub>	7,8·10 <sup>8</sup>	5,5·10 <sup>8</sup>	4,0·10 <sup>8</sup>	3,2·10 <sup>8</sup>	3·10 <sup>8</sup>	6,5·10 <sup>7</sup>
	fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	N <sub>t</sub>	7,2·10 <sup>8</sup>	6,2·10 <sup>6</sup>	2,0·10 <sup>6</sup>	5,5·10 <sup>3</sup>	2,6·10 <sup>2</sup>	9·10 <sup>1</sup>

Forma celular	Tratamiento	Recuento	0'	5'	10'	20'	30'
Esporos	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /TiO <sub>2</sub>	N <sub>t</sub>	2,6·10 <sup>3</sup>		1,5·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	7·10 <sup>2</sup>
	fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	N <sub>t</sub>	2·10 <sup>3</sup>	2,2·10 <sup>2</sup>	2,0·10 <sup>2</sup>	1,6·10 <sup>2</sup>	1,8·10 <sup>2</sup>

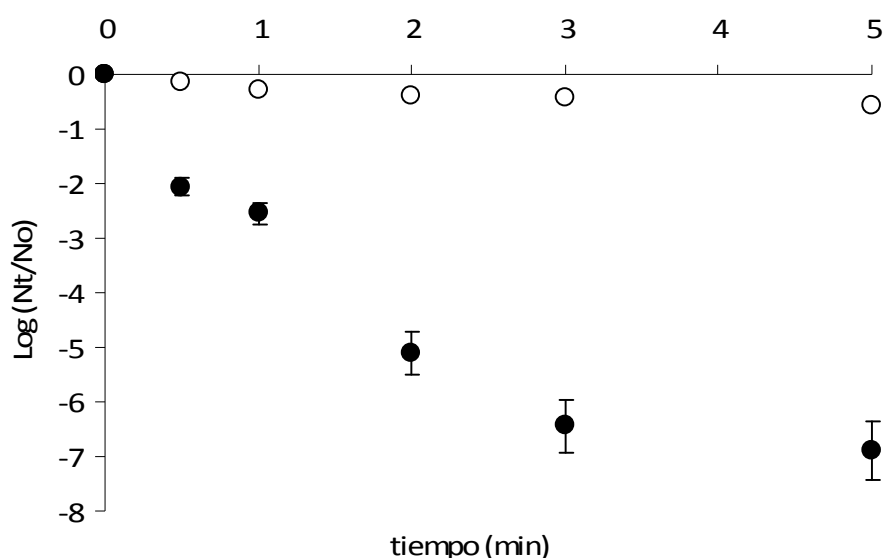


Figura 5.10. Inactivación de células vegetativas de *C. perfringens* en el tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> (○) y fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (●) sobre la muestra natural.  $\lambda$ =320-800 nm. N<sub>0</sub>=7,2·10<sup>8</sup> UFC· 100 mL<sup>-1</sup>. [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=0,04 mM. [TiO<sub>2</sub>]=1 g L<sup>-1</sup>.

De estos resultados se puede derivar que no se aprecia un fenómeno de sinergia entre el TiO<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en presencia de irradiación, que permita obtener los máximos resultados de desinfección entre todos los tratamientos aplicados, como cabría esperar, pues participan conjuntamente tres agentes desinfectantes.

Este comportamiento puede deberse a que ante una concentración tan elevada de radicales activos, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en lugar de favorecer la acción desinfectante del proceso,

participe como secuestrador de radicales hidroxilo formando radicales hidroperóxidos o peroxo-compuestos en la superficie del  $\text{TiO}_2$ , perjudicando la actividad del proceso fotocatalítico, tal y como describe Kositzi (2004). Estos radicales hidroperóxidos son menos reactivos en cuanto a desinfección (Legrini *et al.*, 1993). De aquí se deriva la importancia de que se establezca una dosis adecuada en la combinación de tratamientos para no obtener un efecto contrario al buscado.

Por otro lado, Maness (1999) establece la importancia de la interacción superficie del catalizador- microorganismo para que los radicales ROS generados en el tratamiento actúen de manera directa sobre la bacteria. Si en lugar de que el radical se una al microorganismo, se unen dos radicales entre sí porque su número es mayor y por tanto, la probabilidad de unión entre radicales aumenta, la efectividad bactericida del tratamiento disminuye, siendo necesarios tiempos más prolongados de exposición. También se ha publicado que la presencia de compuestos orgánicos presentes de manera natural en el agua e incrementadas de manera colateral por la lisis de las bacterias durante el tratamiento, afectan de manera negativa sobre la desinfección fotocatalítica, pues compiten con las bacterias activas por las especies oxidativas fotogeneradas. Por lo tanto, la composición natural del agua es otro factor condicionante en la efectividad de estos tratamientos (Rincón y Pulgarin, 2005, 2007).

Con respecto a los esporos, el comportamiento observado es parecido. La curva de inactivación representada en la Figura 5.11 durante el tratamiento de fotocátalisis/ $\text{H}_2\text{O}_2$  es muy similar a la observada en la Figura 5.9 con el tratamiento irradiación/ $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se obtiene un orden de inactivación de  $1 \pm 0,08$  unidad logarítmica a los 30 minutos. En consecuencia, se puede decir también que la combinación de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en presencia de irradiación, no mejora la desinfección obtenida sobre los esporos con respecto a los tratamientos de fotocátalisis e irradiación/ $\text{H}_2\text{O}_2$  aplicados. Nuevamente se deriva la falta de sinergia entre el  $\text{TiO}_2$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en presencia de luz.

A nivel estadístico, sólo existen diferencias muy significativas entre el tratamiento fotocátalisis/ $\text{H}_2\text{O}_2$  y el tratamiento de irradiación ( $p < 0,01$ ).

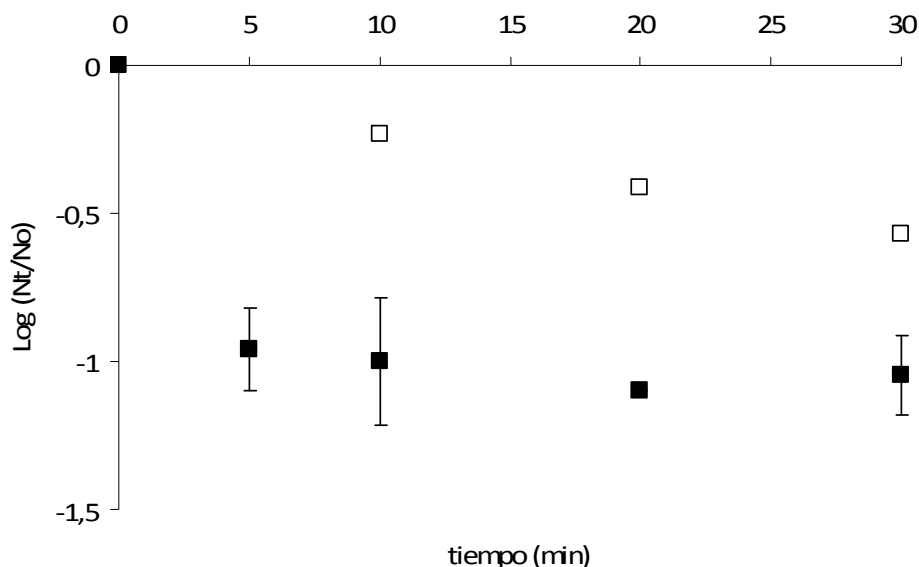


Figura 5.11. Inactivación de esporos de *C. perfringens* en el tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> (□) y fotocatalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (■) sobre la muestra natural.  $\lambda=320-800$  nm.  $N_0=2\cdot 10^3$  UFC· 100 mL<sup>-1</sup>. [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=0,04 mM. [TiO<sub>2</sub>]=1 g L<sup>-1</sup>.

Nuevamente, los tratamientos sobre esporos demuestran ser más resistentes a la agresión del medio que las células vegetativas, como también han constatado otros autores en otras condiciones de trabajo (Lonnen *et al.*, 2005; Dunlop *et al.*, 2008). En estos experimentos se observa que los esporos sobreviven a los tratamientos estudiados a pesar de la concentración residual de peróxido de hidrógeno detectada durante los mismos (0,5 mg L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

#### 5.2.1.6. Estudio de influencia de variables

Para estudiar la influencia de las diversas variables que participan en los tratamientos de desinfección aplicados sobre las poblaciones de *C. perfringens* (células vegetativas y esporos), se sigue la metodología descrita en el apartado 3.4.1. El factor respuesta seleccionado es la inactivación logarítmica de las poblaciones bacterianas.

Se utiliza un nivel de confianza del 95% para el análisis de resultados, centrado en el estudio de las variables tiempo de tratamiento, TiO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los niveles escogidos para cada una de dichas variables se muestran en la Tabla 5.5.

Tabla 5.5. Niveles de las variables en los tratamientos de radiación solar sobre *C. perfringens* (células vegetativas y esporos).

Variable	Nivel
----------	-------

<b>Tiempo de tratamiento</b>	1 minuto/ 5 minutos
<b>TiO<sub>2</sub></b>	ausencia/ presencia
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	ausencia/ presencia

En las Figuras 5.12 y 5.13 se representan los efectos de cada una de las variables seleccionadas sobre la inactivación logarítmica de las células vegetativas y esporos, respectivamente. Se observa en ambos casos que las tres variables tienen una influencia positiva sobre el factor respuesta, ya que la pendiente de la recta es positiva. De las variables estudiadas sobre las células vegetativas (Figura 5.12), el tiempo y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son más influyentes que el TiO<sub>2</sub> debido a la mayor pendiente de la recta. Para los esporos, las pendientes son similares lo que indica una influencia similar de las tres variables sobre el factor respuesta.

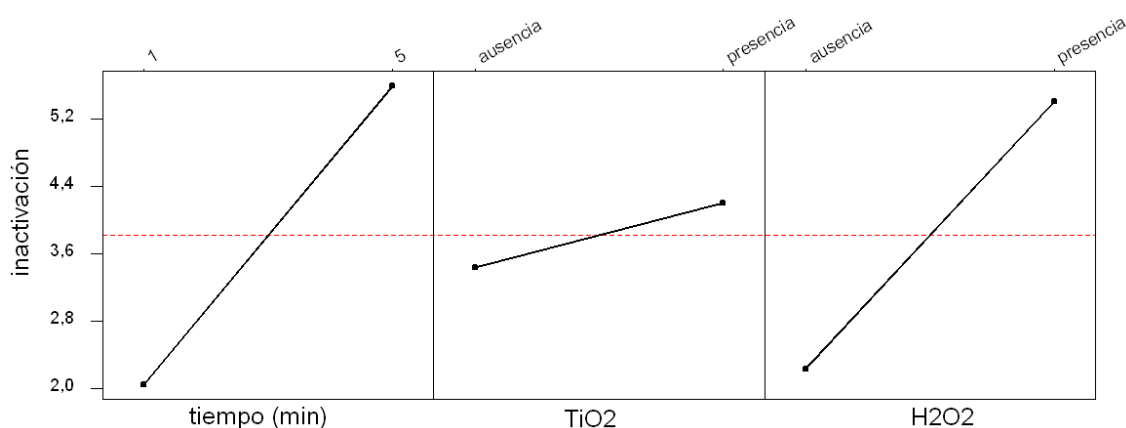


Figura 5.12. Influencia de las variables seleccionadas en los procesos de radiación solar sobre las células vegetativas de *C. perfringens*.

Estas conclusiones derivadas de la influencia de las variables concuerdan con los resultados obtenidos en los apartados 5.2.1.2 - 5.2.1.5 del presente capítulo. Sobre las formas vegetativas, los tratamientos que mejor resultados alcanzan son la irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la fotocatálisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que sobre las formas esporuladas, la fotocatálisis es el mejor tratamiento, seguido de cerca por la irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la fotocatálisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

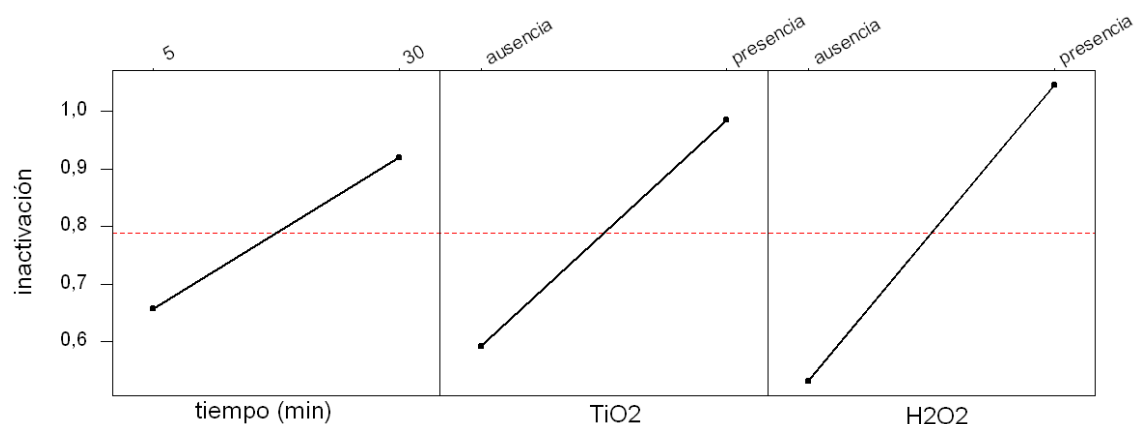


Figura 5.13. Influencia de las variables seleccionadas en los procesos de radiación solar sobre los esporos de *C. perfringens*.

Una vez determinada la influencia de cada una de las variables seleccionadas, se estudia su interacción.

Tal y como se muestra en las Figuras 5.14 y 5.15, correspondientes a las células vegetativas y esporos respectivamente, la interacción más significativa para ambas formas celulares es la combinación [TiO<sub>2</sub>][H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>], pues sus líneas de tendencia se cortan. En ambas figuras se observa que en ausencia de peróxido de hidrógeno, la presencia de TiO<sub>2</sub> influye positivamente en la reducción de las poblaciones. Sin embargo, en presencia de peróxido de hidrógeno, se obtienen ligeramente mejores resultados cuando no está presente el catalizador. Estas representaciones confirman los resultados obtenidos en los apartados 5.2.1.2 - 5.2.1.5 del presente capítulo, ya que para ambas formas de *C. perfringens*, los tratamientos de irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtienen inactivaciones superiores a las obtenidas en los tratamientos de fotocatalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, existiendo una interacción entre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el TiO<sub>2</sub>, pero no de carácter sinérgico, como se deriva de los resultados mostrados en el apartado 5.2.1.4.

Respecto a los esporos, se observa que las interacciones [tiempo][TiO<sub>2</sub>] y [tiempo][H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] son más importantes que en el caso de las células vegetativas porque las líneas tienden a cruzarse.

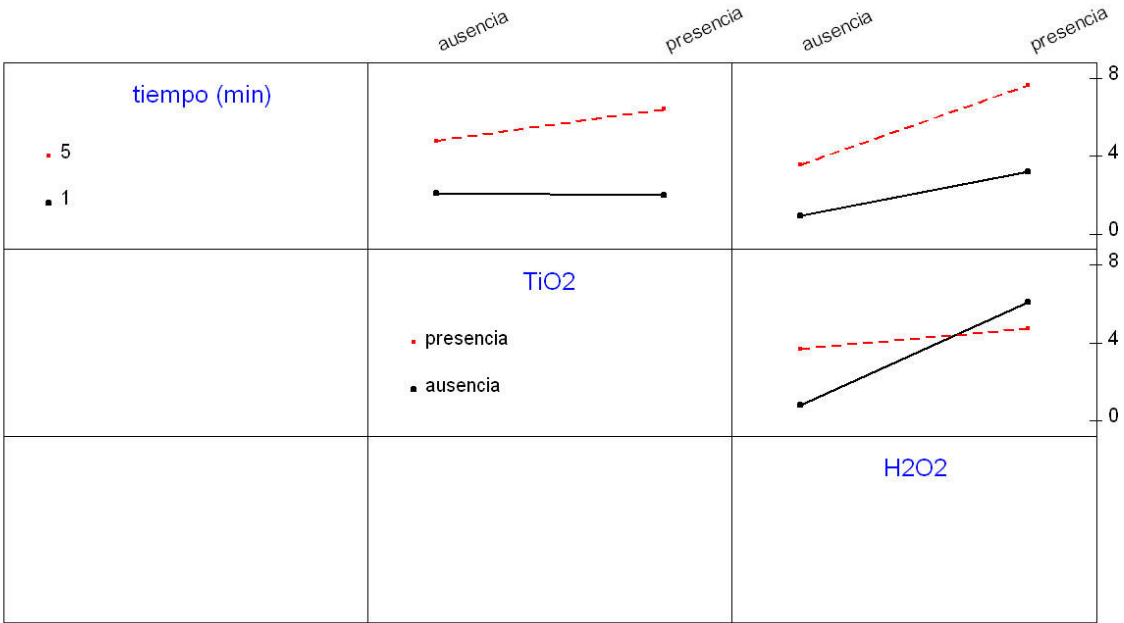


Figura 5.14. Representación gráfica de las interacciones entre variables sobre las células vegetativas de *C. perfringens*.

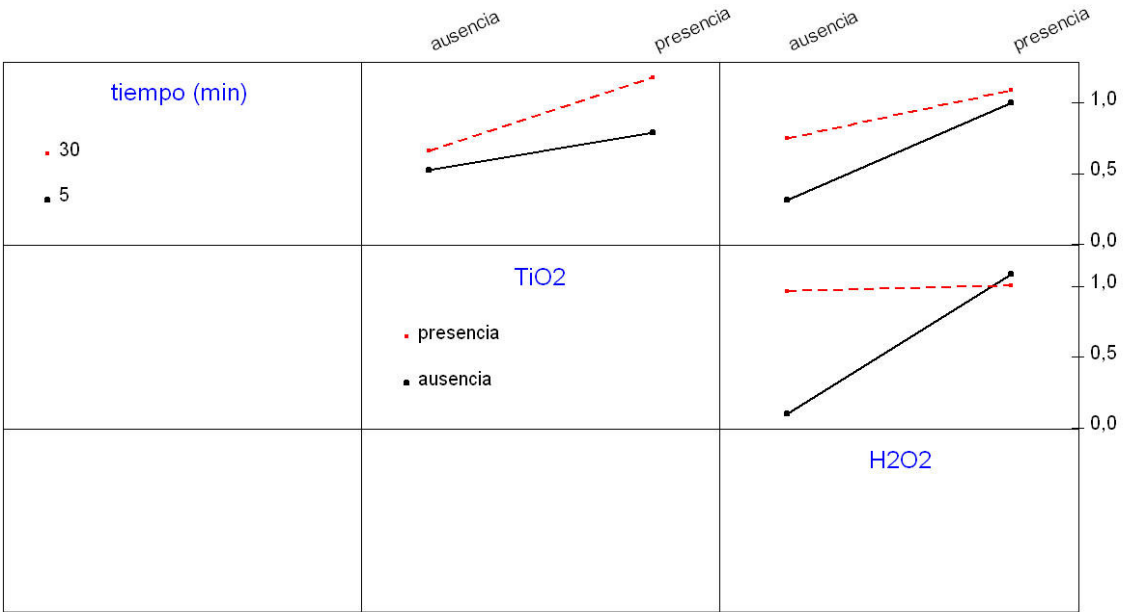


Figura 5.15. Representación gráfica de las interacciones entre variables sobre los esporos de *C. perfringens*.

## 5.2.2. Inactivación de *Enterococcus* sp.

### 5.2.2.1. Condiciones de operación

La duración de los experimentos de irradiación, irradiación/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , fotocátalisis y fotocátalisis/ $\text{H}_2\text{O}_2$  es de 30 minutos.



Los experimentos se realizan a temperatura ambiente (23 °C) y las temperaturas máximas que se alcanzan durante los mismos son 29-30 °C.

Las dosis de TiO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aplicadas son de 1 g L<sup>-1</sup> y 0,04 mM respectivamente, dosis iguales a las utilizadas en los ensayos con *C. perfringens*, tal y como se indica en el apartado 5.2.1.1 del presente capítulo.

A lo largo del desarrollo de los experimentos se toman muestras a diferentes intervalos de tiempo con la finalidad de evaluar el efecto de los tratamientos sobre las poblaciones bacterianas de *Enterococcus* sp. En las muestras que provienen de los tratamientos en los que ha participado el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, su dosis residual se neutraliza con tiosulfato sódico con el objeto de anular su efecto bactericida.

Los rangos de radiación solar utilizados se corresponden con dos opciones: filtro de cuarzo (radiación UVB, UVA y visible, 290-800 nm) y filtro de cuarzo + filtro de ventana (radiación UVA y visible, 320-800 nm). La ausencia del factor filtro de ventana permite el estudio de la influencia del rango UVB del espectro solar sobre las poblaciones de *Enterococcus* sp.

Rincón y Pulgarin (2003) establecen que en un fotorreactor real, la irradiación aplicada sobre la muestra no es continua ya que tras el proceso, el agua pasa a zonas de oscuridad. Incluso en el medio natural, las nubes impiden una radiación solar continua durante las horas de luz. Como consecuencia, hay momentos en los que los tratamientos se interrumpen y los microorganismos pueden desarrollar mecanismos de autorreparación que les permiten resistir durante más tiempo nuevas sesiones de desinfección. En base a este hecho, se estudia también la influencia de irradiación continua e intermitente en los ensayos realizados, con una sola parada de 45 sg a mitad del tratamiento en el primer caso y con paradas de 45 sg cada 5 minutos de tratamiento en el segundo caso.

Otro factor estudiado por Rincón y Pulgarin (2007) sobre poblaciones de *E. coli* es la duración de la desinfección solar una vez terminado el proceso. Para estudiar este factor sobre *Enterococcus* sp., se mantiene la muestra en oscuridad durante un periodo de 180 minutos tras la finalización de los tratamientos de irradiación aplicados.

### 5.2.2.2. Resultados de los tratamientos con radiación UVB, UVA y visible (290-800nm)

#### *Influencia del tipo de proceso utilizado*

La Tabla 5.6 muestra los recuentos bacterianos obtenidos durante los tratamientos de irradiación, fotocátalisis, irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la Tabla 5.7 las poblaciones supervivientes de *Enterococcus* sp. sometidas a los mismos tratamientos, en ausencia de radiación solar. Los resultados observados en esta última tabla ponen de manifiesto la ausencia de desinfección del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, del TiO<sub>2</sub> y del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> sobre la población bacteriana inicial. Sin embargo, sobre las poblaciones celulares y esporuladas de *C. perfringens*, el peróxido mostraba un ligero carácter desinfectante (Tabla 5.3 y 5.4).

Rincón y Pulgarin (2001, 2003) también constatan sobre poblaciones de *E. coli* que el TiO<sub>2</sub> por si mismo no actúa como agente germicida en oscuridad. Respecto al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, los resultados de Mamane (2007) no mostraron inactivación de ningún microorganismo estudiado (*E. coli*, esporos de *B. subtilis* y bacteriófagos) frente a 10 y 25 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tras 60 minutos de contacto. Por el contrario, Sommer (2004) mostró que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración de 50 mg L<sup>-1</sup> tras un tiempo de contacto de 3 horas, afectaba débilmente a la viabilidad de *E. coli*.

La Figura 5.16 representa las curvas de inactivación de *Enterococcus* sp. durante los tratamientos de irradiación, fotocátalisis, irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La inactivación, en unidades logarítmicas, se representa vs. tiempo, en minutos.

Tabla 5.6. Recuentos de *Enterococcus* sp. (UFC·100mL<sup>-1</sup>) durante los tratamientos de irradiación, fotocátalisis, irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\lambda$ : 290-800 nm) sobre la muestra natural.

Tratamiento	0'	2'	5'	10'	15'	20'	25'	30'
Irradiación	2,1·10 <sup>8</sup>	2,3·10 <sup>3</sup>	5,0·10 <sup>2</sup>	2·10 <sup>2</sup>	5,1·10 <sup>1</sup>	5,6·10 <sup>1</sup>	5,5·10 <sup>0</sup>	8·10 <sup>0</sup>
Irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2,3·10 <sup>8</sup>	2,7·10 <sup>2</sup>	1,7·10 <sup>2</sup>	6,4·10 <sup>1</sup>	2,5·10 <sup>0</sup>	5·10 <sup>0</sup>	2·10 <sup>0</sup>	0
Fotocátalisis	1,8·10 <sup>8</sup>	3,2·10 <sup>5</sup>	7,4·10 <sup>4</sup>	1,9·10 <sup>4</sup>	1,2·10 <sup>4</sup>	1,6·10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	1,3·10 <sup>3</sup>
Fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2·10 <sup>8</sup>	1,1·10 <sup>7</sup>	2,4·10 <sup>5</sup>	1,1·10 <sup>4</sup>	6,6·10 <sup>3</sup>	2,6·10 <sup>3</sup>	1,5·10 <sup>3</sup>	4,3·10 <sup>2</sup>

Tabla 5.7. Recuentos de *Enterococcus* sp. (UFC·100mL<sup>-1</sup>) antes y después de los tratamientos de oscuridad, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub> y TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la muestra natural.

Tiempo (min)	Oscuridad	TiO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	TiO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0	1,9·10 <sup>8</sup>	1,2·10 <sup>8</sup>	1,2·10 <sup>8</sup>	1,4·10 <sup>8</sup>
30	1,4·10 <sup>8</sup>	2,0·10 <sup>8</sup>	1,0·10 <sup>8</sup>	1,5·10 <sup>8</sup>

La inactivación observada durante los primeros minutos de tratamiento es elevada en los experimentos realizados, alcanzándose la desinfección completa de la muestra solamente en el proceso de irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

El tratamiento irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtiene un resultado de  $8,3 \pm 0,2$  logaritmos, seguido por el proceso de irradiación que consigue una inactivación final de  $7,6 \pm 0,7$  unidades logarítmicas y finalmente, la fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la fotocátalisis que alcanzan reducciones de  $5,9 \pm 0,8$  y  $5,5 \pm 1$  unidades logarítmicas respectivamente. La adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mejora el nivel de inactivación alcanzado tanto por la irradiación como por la fotocátalisis. En el periodo final de los experimentos, la inactivación bacteriana se ralentiza ya que permanece un menor número de bacterias supervivientes en el medio conforme avanza el proceso, lo que favorece que dichas bacterias compitan entre sí y con los componentes liberados de las bacterias muertas en los primeros instantes, tal y como establecen Rincón y Pulgarin (2003).

A nivel estadístico, no existen diferencias significativas entre los cuatro tratamientos aplicados bajo las condiciones de estudio descritas ( $p > 0,05$ ).

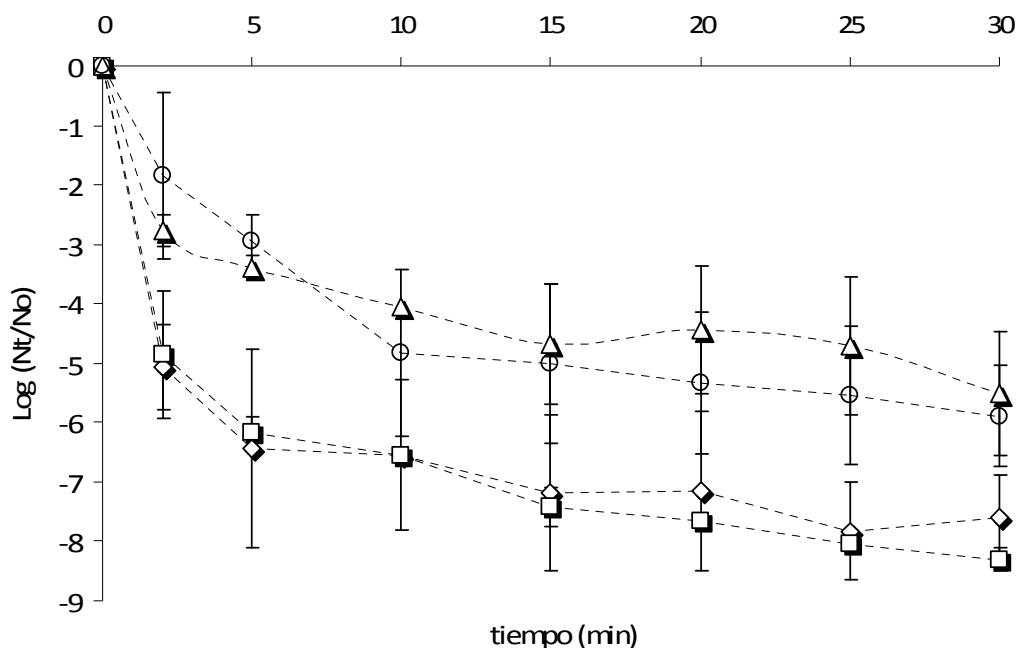


Figura 5.16. Inactivación de *Enterococcus* sp. en los tratamientos de irradiación (◇), fotocátalisis (△), irradiación/ $\text{H}_2\text{O}_2$  (□) y fotocátalisis/ $\text{H}_2\text{O}_2$  (○) sobre la muestra natural.  $N_0 \approx 10^8$  UFC  $\cdot$  100  $\text{mL}^{-1}$ . Rango de  $\lambda$ : 290-800 nm.  $[\text{H}_2\text{O}_2]=0,04$  mM.  $[\text{TiO}_2]=1$  g  $\text{L}^{-1}$ .  $\lambda=290$ -800 nm.

Estos resultados ponen de manifiesto la poca relevancia que la adición de  $\text{TiO}_2$  y de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por separado y en conjunto suponen sobre el efecto individual de la irradiación cuando ésta incluye el rango UVB del espectro solar.

El rango UVB tiene una elevada capacidad bactericida por si solo, produciendo lesiones graves en el material genético celular que se traducen en un impedimento en la replicación del ADN y en la generación de mutaciones génicas, tal y como establece Benabbou (2007). Estos resultados son conherentes con los mostrados por Mamane (2007), quien observa que el tratamiento UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\lambda$  295-400 nm, 25  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) no manifiesta un efecto de mejora en comparación con el tratamiento UV por si solo sobre el bacteriófago T4, ni tampoco se diferencian los niveles de mortalidad alcanzados por ambos tratamientos sobre la bacteria *E. coli* para una concentración de 10  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sin embargo, en contraposición, Benabbou (2007) alcanza mejores resultados con el sistema UVB/ $\text{TiO}_2$  ( $\lambda$  290-400 nm) que con el sistema UVB sobre poblaciones de *E.coli*.

***Influencia del periodo de recuperación en oscuridad***

La Figura 5.17 muestra la evolución poblacional de *Enterococcus* sp. durante un periodo de oscuridad de 180 minutos. La línea discontinua separa la inactivación observada durante los ensayos realizados en presencia de irradiación, del progreso seguido por las bacterias en oscuridad una vez desaparecen los agentes que les generan estrés.

Sólo se puede analizar cómo influye el periodo de recuperación en las poblaciones bacterianas tras el tratamiento irradiación solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> porque es el único que alcanza una eliminación completa de las poblaciones iniciales. Para el resto de tratamientos se observa cómo las poblaciones supervivientes son capaces de recuperar sus actividades vitales y crecer. El ataque del sistema irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre las poblaciones de *Enterococcus* sp. no permite que las bacterias se recuperen en oscuridad y por tanto, no se observa un recrecimiento posterior.

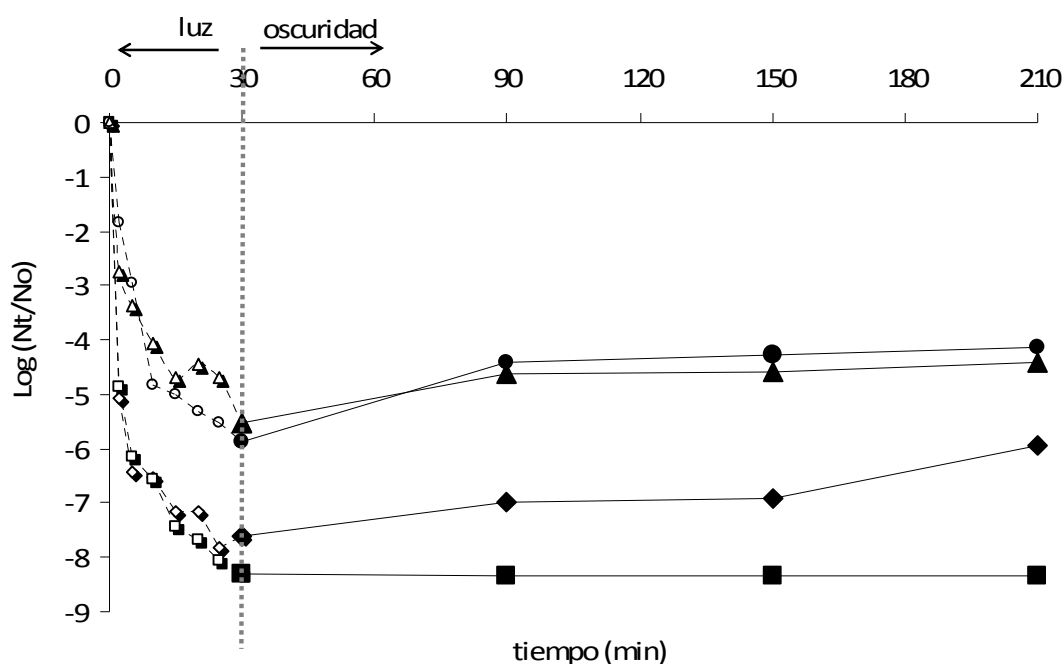


Figura 5.17. Inactivación de *Enterococcus* sp. tras los tratamientos de irradiación (♦), fotocátalisis (▲), irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (■) y fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (●). La línea discontinua marca el comienzo del periodo de de oscuridad.  $\lambda$ : 290-800 nm.  $N_0 \approx 10^8$  UFC · 100 mL<sup>-1</sup>. [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=0,04 mM. [TiO<sub>2</sub>]=1 g L<sup>-1</sup>.

Rincón y Pulgarin (2006) sólo detectan recrecimientos bacterianos después de 24/48 h de finalizar el tratamiento de radiación solar sobre poblaciones de *E. coli*, no así

tras los tratamientos de fotocátalisis y radiación-Fe<sup>+3</sup>, que mantienen un efecto residual en la desinfección.

En contraposición, Boyle (2008), tras realizar un tratamiento con radiación solar natural (SODIS), no observa recrecimiento de las poblaciones bacterianas de estudio (*Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* y *E. coli*) después de 48h. Wist (2002) defiende la carencia de efecto residual del tratamiento fotocatalítico. Muestra una recuperación de sus poblaciones de *E. coli* después de 24 horas en oscuridad, alcanzando los valores iniciales, así como concentraciones superiores a las iniciales al prolongar dicho periodo a 48 horas.

Ante la diversidad de resultados recogidos en la literatura científica, es claro que durante los procesos ensayados en este trabajo de investigación, la acción directa de la irradiación (290-800 nm) se combina con las especies radicalarias oxidativas generadas por la activación del TiO<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, generando en conjunto daños sobre las bacterias. Sin embargo, estos daños no son siempre irremediables, pues las células dañadas por radiación ultravioleta son capaces de desarrollar mecanismos de reparación del ADN, entre los que destacan el mecanismo de fotorreactivación, activado por longitudes de onda del espectro solar visible y el mecanismo de reparación en oscuridad (Wist *et al.*, 2002). En ambos casos, diferentes enzimas participan en la reversión de los daños producidos sobre bases pirimidínicas del material genético (Gamazo *et al.*, 2005).

Con el objeto de evitar recrecimientos posteriores en aguas tratadas resulta necesario obtener inactivaciones totales de los microorganismos presentes en las mismas. Rincón y Pulgarín (2004) sugieren analizar el parámetro EDT (effective disinfection time) para asegurar la desinfección completa de las aguas tratadas. Con este parámetro se pretende determinar la duración del tratamiento de desinfección que asegura la muerte bacteriana y por tanto, el fin del tratamiento, aunque probablemente exista una limitación de índole económica. Otra posible opción sería utilizar un desinfectante secundario, como el cloro, para evitar recrecimientos a partir de los individuos que hayan sobrevivido a los tratamientos. En este caso, la generación de subproductos halogenados peligrosos habrá disminuido en buena parte debido a la

reducción de los niveles de la materia orgánica presentes en el agua en los tratamientos aplicados previamente.

### 5.2.2.3. Resultados de los tratamientos con radiación UVA y visible (320-800nm)

#### *Influencia del tipo de proceso utilizado*

La Tabla 5.8 recoge los recuentos bacterianos de *Enterococcus* sp. obtenidos durante los procesos de irradiación, irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fotocátalisis y fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mostrándose sus correspondientes curvas de inactivación en la Figura 5.18.

Tabla 5.8. Recuentos de *Enterococcus* sp. (UFC·100mL<sup>-1</sup>) durante los tratamientos de irradiación, fotocátalisis, irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la muestra natural.  $\lambda$ : 320-800 nm.

Tratamiento	0'	5'	10'	15'	20'	25'	30'
Irradiación	2,1·10 <sup>8</sup>	2·10 <sup>8</sup>	1,6·10 <sup>8</sup>	1,7·10 <sup>8</sup>	1,6·10 <sup>8</sup>	1,6·10 <sup>8</sup>	1,1·10 <sup>8</sup>
Irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,3·10 <sup>8</sup>	1,2·10 <sup>8</sup>	1,1·10 <sup>8</sup>	9,6·10 <sup>7</sup>	7,8·10 <sup>7</sup>	7,9·10 <sup>7</sup>	5,6·10 <sup>7</sup>
Fotocátalisis	2,1·10 <sup>8</sup>	1,4·10 <sup>8</sup>	3,7·10 <sup>7</sup>	1,5·10 <sup>7</sup>	7,5·10 <sup>6</sup>	1,9·10 <sup>6</sup>	8,9·10 <sup>5</sup>
Fotocátalisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,2·10 <sup>8</sup>	9·10 <sup>7</sup>	1,8·10 <sup>7</sup>	9,1·10 <sup>6</sup>	1·10 <sup>7</sup>	2,4·10 <sup>6</sup>	2·10 <sup>6</sup>

Se observa que la sola aplicación de irradiación sobre la muestra no tiene casi efecto sobre las poblaciones, alcanzándose a los 30 minutos de tratamiento un resultado de inactivación de  $0,3 \pm 0,1$  unidades logarítmicas.

Adicionando a la muestra una sustancia fotoactiva como el peróxido de hidrógeno, se observan también poblaciones elevadas durante el tratamiento, alcanzándose un nivel máximo de desinfección de  $0,4 \pm 0,3$  unidades logarítmicas a los 30 minutos. Estadísticamente, no se detectan diferencias significativas entre los tratamientos de irradiación y de irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $p > 0,05$ ).

Sin embargo, tras adicionar dióxido de titanio al ensayo, los resultados de inactivación obtenidos mejoran. En la Figura 5.18 se observa una reducción logarítmica final con el tratamiento de fotocátalisis de  $2,3 \pm 0,3$  unidades, detectándose diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ) respecto a los tratamientos de irradiación e irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El dióxido de titanio se activa bajo longitudes de onda inferiores a 400 nm,

potenciándose su acción bactericida, tal y como ha sido observado por numerosos autores referenciados en el apartado 2.4.5 de la presente memoria.

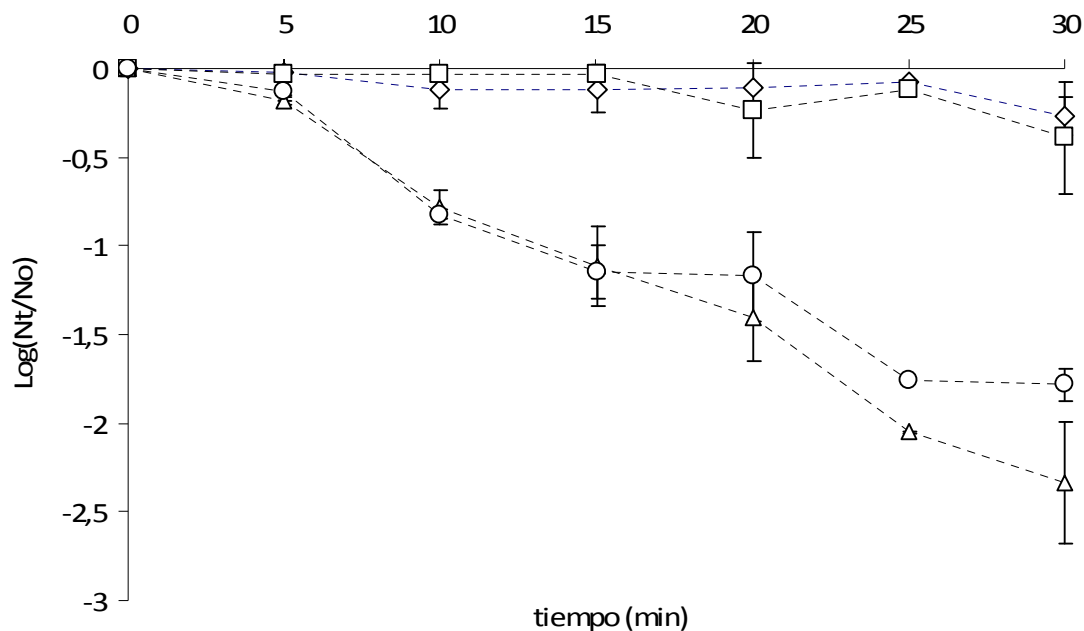


Figura 5.18. Inactivación de *Enterococcus* sp. en los tratamientos de irradiación (◇), fotocátalisis (△), irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (□) y fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (○). Iluminación intermitente.  $\lambda$ : 320-800 nm.  $N_0 \approx 10^8$  UFC·100 mL<sup>-1</sup>. [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=0,04 mM. [TiO<sub>2</sub>]=1 g L<sup>-1</sup>.

El último tratamiento representado corresponde al proceso fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este tratamiento consigue disminuir las poblaciones iniciales de *Enterococcus* sp. en  $1,8 \pm 0,09$  unidades logarítmicas al final de experimento, con una curva similar a la de la fotocátalisis; por tanto, mejora la capacidad desinfectante respecto a los procesos de irradiación solar e irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero se mantiene ligeramente por debajo del tratamiento fotocatalítico. Desde el punto de vista estadístico, no se detectan diferencias significativas con respecto a la fotocátalisis ( $p > 0,05$ ), pero sí que presenta diferencias significativas con los tratamientos de irradiación e irradiación solar/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $p < 0,05$ ).

La pendiente de inactivación de los tratamientos de irradiación e irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es muy poco pronunciada. Este bajo poder de desinfección al comienzo de estos tratamientos es también observado por los autores Rincón y Pulgarin (2003) sobre poblaciones de *E. coli*. Hasta después de 60 minutos no observan



una aceleración en las cinéticas de inactivación. Varios autores atribuyen este comportamiento a los mecanismos de autodefensa de las propias células que les permite contrarrestar, durante un periodo de tiempo variable en función del grado de agresión, esa alteración (Rincón y Pulgarin, 2003; Hoerter et al., 2005). Los microorganismos son capaces de responder a las alteraciones del medio de manera activa hasta que el grado de estrés producido llega a niveles elevados y se altera su funcionalidad.

En contraposición, tanto para el tratamiento de fotocatálisis como para el tratamiento fotocatálisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la elevada concentración de radicales hidroxilo, entre otros ROS, consiguen superar los mecanismos autodefensivos de *Enterococcus* sp., produciendo una disminución rápida de los recuentos bacterianos tras los 5 minutos de comienzo de los experimentos. Resultados muy similares son obtenidos por Rincón y Pulgarin sobre poblaciones de *E. coli* (Rincón y Pulgarin, 2003).

Benabbou (2007) también sugiere que como consecuencia de la muerte celular, se liberan al medio entre otros compuestos, iones de hierro (II y III), hasta entonces retenidos en el interior de las bacterias, lo que provoca reacciones foto-Fenton que aceleran el proceso de muerte celular ya comenzado por las especies radicalarias oxidativas. Por tanto, son muchos los factores que pueden intervenir en el proceso de desinfección.

Bajo estas condiciones de operación se vuelve a poner de manifiesto, como ya se ha observado previamente sobre *C. perfringens* (células vegetativas y esporos), que la fotocatálisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtiene peores resultados que el tratamiento fotocatalítico, evidenciándose nuevamente la falta de sinergia entre el catalizador y el peróxido de hidrógeno.

Si se comparan los resultados de inactivación de *Enterococcus* sp. con los obtenidos a partir de *C. perfringens*, se deriva que las células vegetativas de *C. perfringens* son las formas bacterianas más sensibles a los tratamientos de irradiación aplicados, pues alcanzan mayores niveles de inactivación en menor tiempo con respecto a *Enterococcus* sp. y a sus formas esporuladas.

Cabe destacar el escaso éxito del tratamiento irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre *Enterococcus* sp., en contradicción con los buenos resultados obtenidos sobre las células

vegetativas y esporos de *C. perfringens* (Figuras 5.8, 5.9 y 5.18). Hay que tener en cuenta que *C. perfringens* es una bacteria anaerobia, contrariamente al carácter aerobio de *Enterococcus* sp. Como ya se ha referenciado en varias ocasiones en el presente trabajo de investigación, el tipo de microorganismo es un factor a tener en cuenta para valorar con cautela la efectividad de los diferentes tratamientos de desinfección aplicados.

### *Influencia de la intermitencia de la irradiación aplicada*

Con el fin de evaluar el efecto que produce la interrupción de la irradiación sobre el proceso de desinfección, se repiten los ensayos representados en la Figura 5.18 pero realizando una única parada a los 15 minutos. La Tabla 5.9 recoge los recuentos bacterianos obtenidos durante los tratamientos realizados.

Tabla 5.9. Recuentos de *Enterococcus* sp. (UFC·100mL<sup>-1</sup>) durante los tratamientos de irradiación, fotocatálisis, irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y fotocatálisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la muestra natural.  $\lambda$ : 320-800 nm.

Tratamiento	0'	15'	30'
Irradiación	$2,9 \cdot 10^8$	$7,9 \cdot 10^7$	$6,9 \cdot 10^7$
Irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$1,0 \cdot 10^8$	$8,8 \cdot 10^7$	$5,7 \cdot 10^7$
Fotocatálisis	$1,5 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^7$	$3,9 \cdot 10^6$
Fotocatálisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$1,4 \cdot 10^8$	$4,1 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$

En la Figura 5.19 se representan gráficamente las curvas de inactivación de *Enterococcus* sp. durante los tratamientos realizados. La irradiación continua induce un efecto bactericida final de 0,63 unidades logarítmicas, resultado superior al obtenido con irradiación intermitente (Figura 5.18). Sin embargo, la fotocatálisis continua consigue una desinfección inferior a la alcanzada por la fotocatálisis intermitente (1,6 log vs. 2,3 log) y la irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y fotocatálisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con iluminación continua consiguen niveles de inactivación similares a las obtenidas con iluminación intermitente (0,2 y 1,8 log vs. 0,4 y 1,9 log, respectivamente).

Rincón y Pulgarin (2003) observan una clara diferencia entre los resultados de los procesos de fotocatálisis continua y discontinua aplicadas sobre *E. coli*, con paradas de 40 sg para la toma de muestras; 30 minutos de fotocatálisis continua conseguían los

misimos resultados, inactivación total, que la fotocátalisis intermitente tras 90 minutos de tratamiento. Sin embargo, bajo las condiciones de estudio de esta investigación, los resultados observados no resultan tan concluyentes. El tratamiento de irradiación es el único que obtiene mejores resultados aplicado de manera continua.

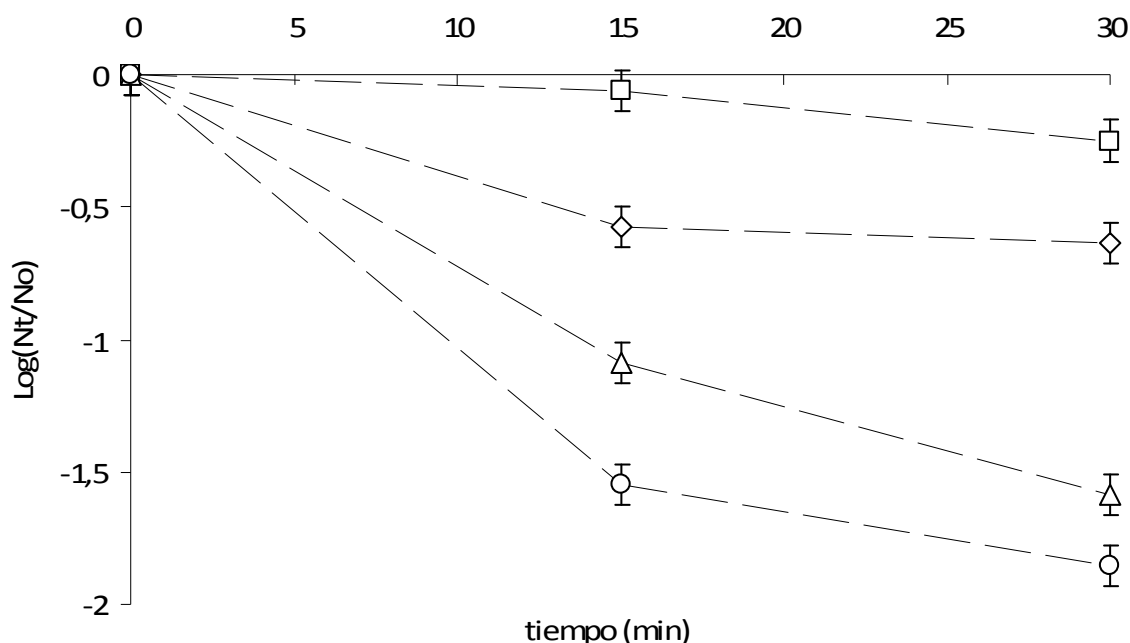


Figura 5.19. Inactivación de *Enterococcus* sp. en los tratamientos de irradiación (◇), fotocátalisis (△), irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (□) y fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (○). Iluminación continua.  $\lambda$ : 320-800 nm.  $N_0 \approx 10^8$  UFC·100 mL<sup>-1</sup>. [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=0,04 mM. [TiO<sub>2</sub>]=1 g L<sup>-1</sup>.

Son necesarios tratamientos más prolongados para obtener una inactivación total de las poblaciones de *Enterococcus* sp., tanto con la aplicación de procesos intermitentes como continuos. Rincón y Pulgarín (2003) establecen que durante los periodos de parada, los mecanismos de autodefensa bacterianos se ven favorecidos, permitiendo a la bacteria estabilizarse ante la agresión sufrida y así, aguantar mejor un posible ataque cercano.

En contraposición, existen también experiencias que defienden la efectividad de los tratamientos interrumpidos. Pham (1995) observó que la iluminación intermitente reducía el número de esporos de *Bacillus pumilus* de manera más efectiva que la exposición continua. Por tanto, ante la escasa literatura científica encontrada al respecto, se ve necesario investigar el efecto de las paradas en los tratamientos con

radiación solar sobre cada tipo de microorganismo, tal y como también sugieren Rincón y Pulgarin (2003).

### *Influencia del periodo de recuperación en oscuridad*

En las Figuras 5.20 y 5.22 se muestra la evolución de las poblaciones bacterianas a lo largo de un periodo de oscuridad de 3 horas (tras una irradiación intermitente en la primera figura y una irradiación continua en la segunda). La línea discontinua separa las curvas de inactivación de las poblaciones en presencia de irradiación, de las poblaciones que se recuperan durante el periodo de oscuridad.

Ninguno de los cuatro tratamientos de radiación solar consigue inactivar por completo las poblaciones bacterianas iniciales, por lo que aunque durante las 3 horas de oscuridad las poblaciones sometidas a los tratamientos de fotocátalisis y fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tienden a recuperarse, al ampliar el estudio a 24 horas (Figura 5.21), las poblaciones al final de dicho periodo no logar superar las concentraciones de partida en el periodo de oscuridad.

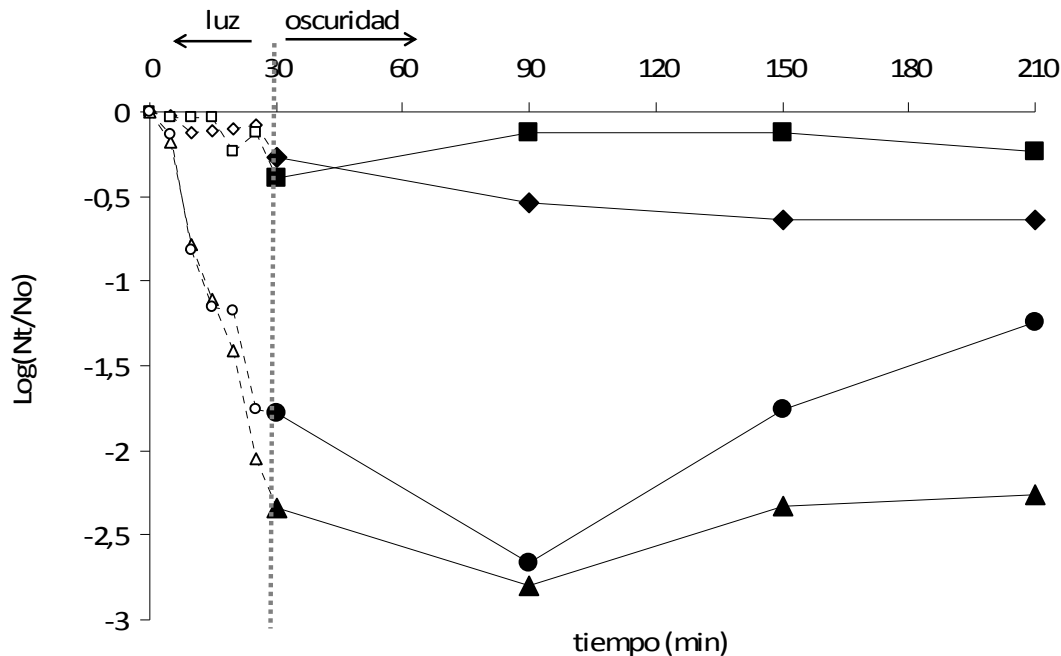


Figura 5.20. Inactivación de *Enterococcus* sp. tras los tratamientos de irradiación (♦), fotocátalisis (▲), irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (■) y fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (●). La línea discontinua marca el comienzo del periodo de de oscuridad de 180 minutos. Iluminación intermitente.  $\lambda = 320-800$  nm.  $N_0 \approx 10^8$  CFU·100 mL<sup>-1</sup>. [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=0,04 mM. [TiO<sub>2</sub>]=1 g L<sup>-1</sup>.

Rincón y Pulgarin (2006) señalan que conforme avanza el periodo en el que las poblaciones bacterianas presentes en el agua desinfectada pueden recuperarse, se produce al mismo tiempo una disminución de las fuentes de nutrientes y carbono disponibles en el medio, perjudicando su capacidad de recuperación.

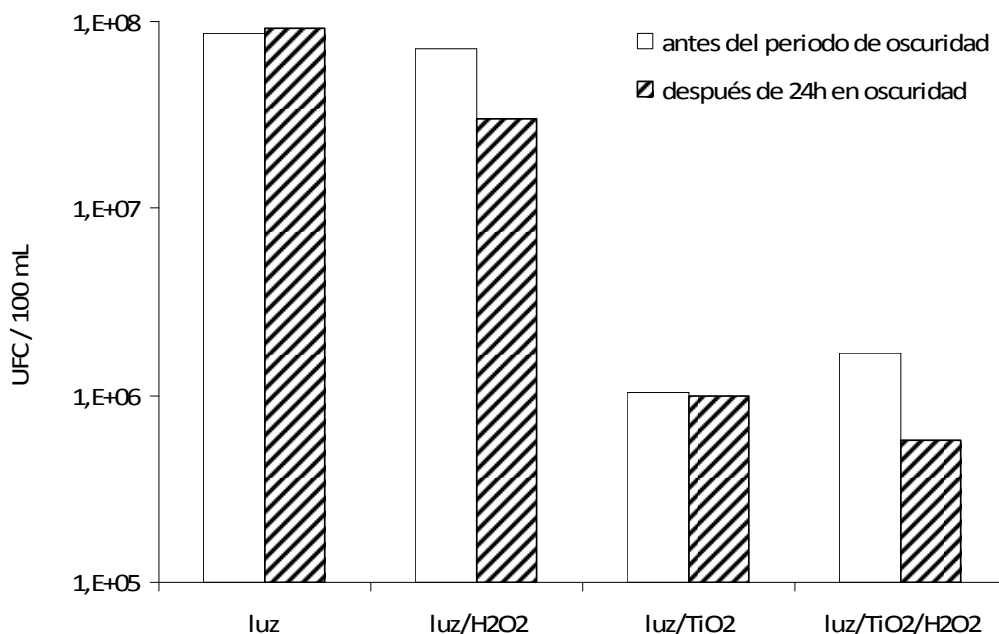


Figura 5.21. Duración de la desinfección obtenida tras los tratamientos aplicados con irradiación continua, después de 24h de permanencia en oscuridad.

En el periodo de oscuridad tras los experimentos de luz realizados con irradiación continua (Figura 5.22), el comportamiento observado es muy similar a los obtenidos con luz intermitente (Figura 5.20). En este caso no se prolongó el periodo de oscuridad hasta 24 horas. Por tanto, si todas las bacterias no son inactivadas por los tratamientos de irradiación, las poblaciones supervivientes, vivas y/o parcialmente dañadas, pueden recuperarse y desarrollarse durante el periodo de oscuridad. En consecuencia, es esencial determinar el tiempo de desinfección efectiva (EDT) de la muestra para alcanzar su completa desinfección y evitar así recrecimientos posteriores.

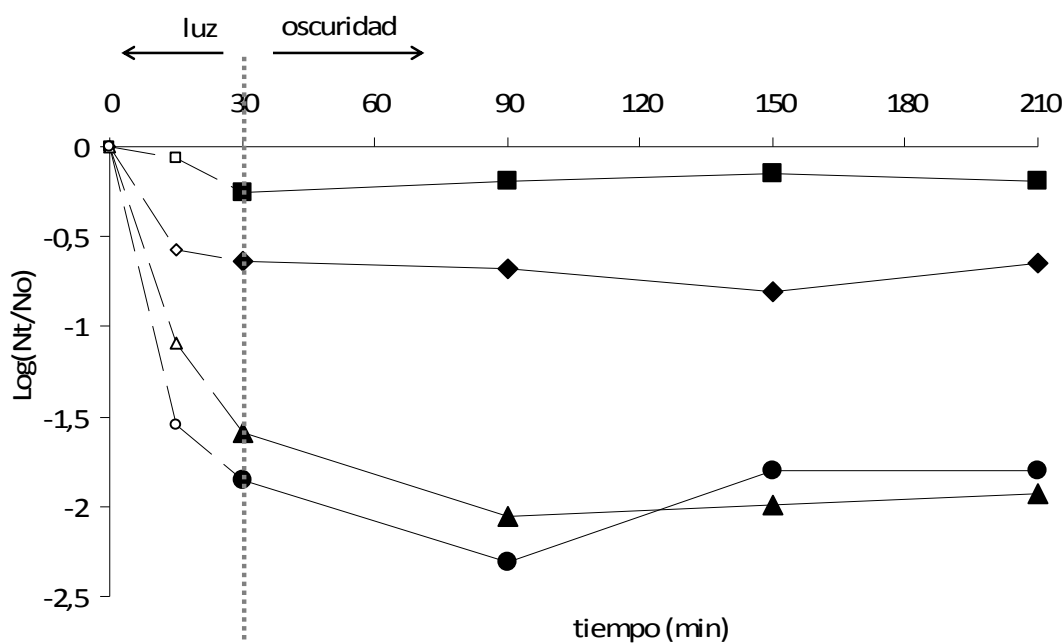


Figura 5.22. Inactivación de *Enterococcus* sp. tras los tratamientos de irradiación (♦), fotocátalisis (▲), irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (■) y fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (●). La línea discontinua marca el comienzo del periodo de de oscuridad de 180 minutos. Iluminación continua.  $\lambda$ : 320-800 nm.  $N_0 \approx 10^8$  CFU·100 mL<sup>-1</sup>. [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=0,04 mM. [TiO<sub>2</sub>]=1 g L<sup>-1</sup>.

#### 5.2.2.4. Estudio de influencia de variables

Con la finalidad de estudiar la influencia de las diversas variables que participan en los tratamientos de desinfección aplicados sobre *Enterococcus* sp., se sigue la metodología descrita en el apartado 3.4.1. El factor respuesta establecido es la inactivación logarítmica de las poblaciones bacterianas.

Se utiliza un nivel de confianza del 95% para el análisis de resultados, centrado en el estudio de las variables tiempo de tratamiento, radiación UVB, TiO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los niveles escogidos para cada variable se muestran en la Tabla 5.10.

Tabla 5.10. Niveles de las variables en los tratamientos de radiación solar sobre *Enterococcus* sp.

Variable	Nivel
Tiempo de tratamiento	5 minutos/ 30 minutos
Radiación UVB	ausencia/presencia
TiO <sub>2</sub>	ausencia/presencia
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ausencia/presencia

En la Figura 5.23 se representa el efecto de cada una de las variables sobre el factor respuesta. La pendiente de la recta es indicativa de la importancia de cada una de las variables seleccionadas en este estudio. La radiación UVB es la variable que mayor efecto tiene sobre la inactivación bacteriana debido a la pendiente de la recta y es positiva. Tanto el  $\text{TiO}_2$  como el tiempo influyen en la inactivación de las poblaciones, aunque el primero de manera negativa y el segundo positivamente. Por otro lado, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  no muestra prácticamente influencia sobre la inactivación de *Enterococcus* sp., ya que no se produce tan apenas modificación de la respuesta para los dos niveles estudiados.

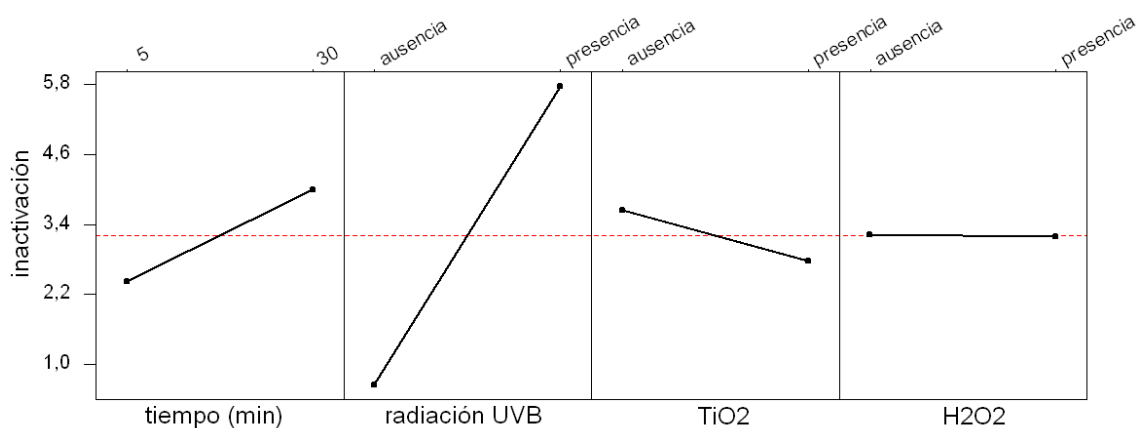


Figura 5.23. Influencia de las variables seleccionadas en los procesos de radiación solar sobre *Enterococcus* sp.

Una vez determinada la influencia de cada una de las variables seleccionadas, se estudia su interacción. Tal y como se muestra en la Figura 5.24, las interacciones son poco importantes ya que las líneas tienen poca tendencia a cruzarse.

Respecto a la interacción [radiación UVB][tiempo], se observa que independientemente del tiempo de tratamiento, la inactivación es mayor cuando está presente el rango UVB. La interacción [ $\text{TiO}_2$ ][tiempo] refleja que la presencia del catalizador conlleva resultados de inactivación peores, mientras que la interacción [ $\text{TiO}_2$ ][radiación UVB] indica que la influencia del catalizador es positiva solamente en ausencia de la radiación UVB. Finalmente, las interacciones del  $\text{H}_2\text{O}_2$  con el tiempo, con la radiación UVB y con el  $\text{TiO}_2$  reflejan para todos los casos que la presencia o ausencia de peróxido no tiene influencia sobre el resto de los factores estudiados, ya que las líneas son prácticamente paralelas.

Por último, para extraer conclusiones sobre cuáles de estas variables e interacciones son más significativas en la inactivación de *Enterococcus* sp. se utiliza el diagrama de Pareto, Figura 5.25.

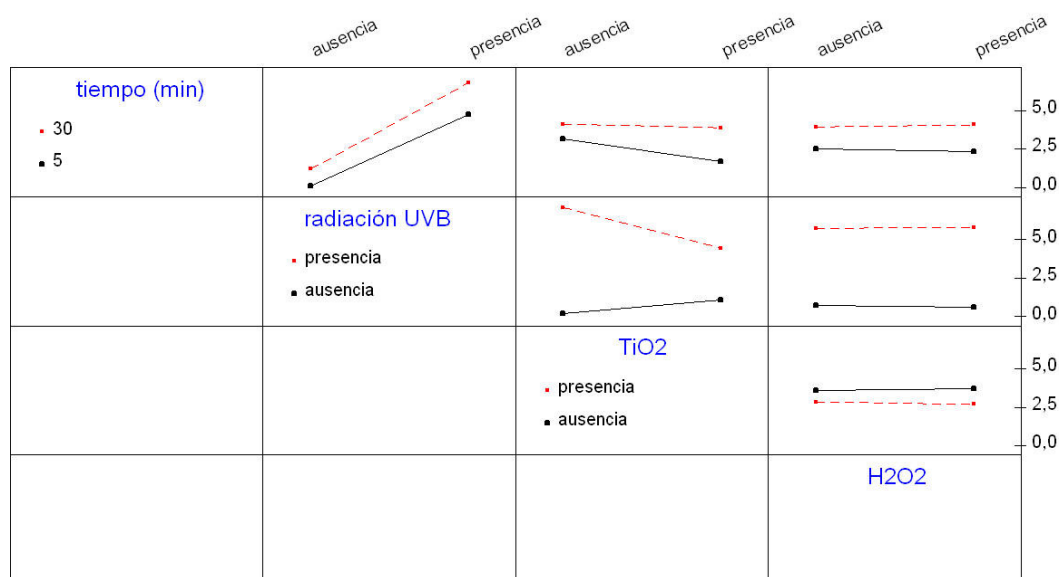


Figura 5.24. Representación gráfica de las interacciones entre variables sobre *Enterococcus* sp.

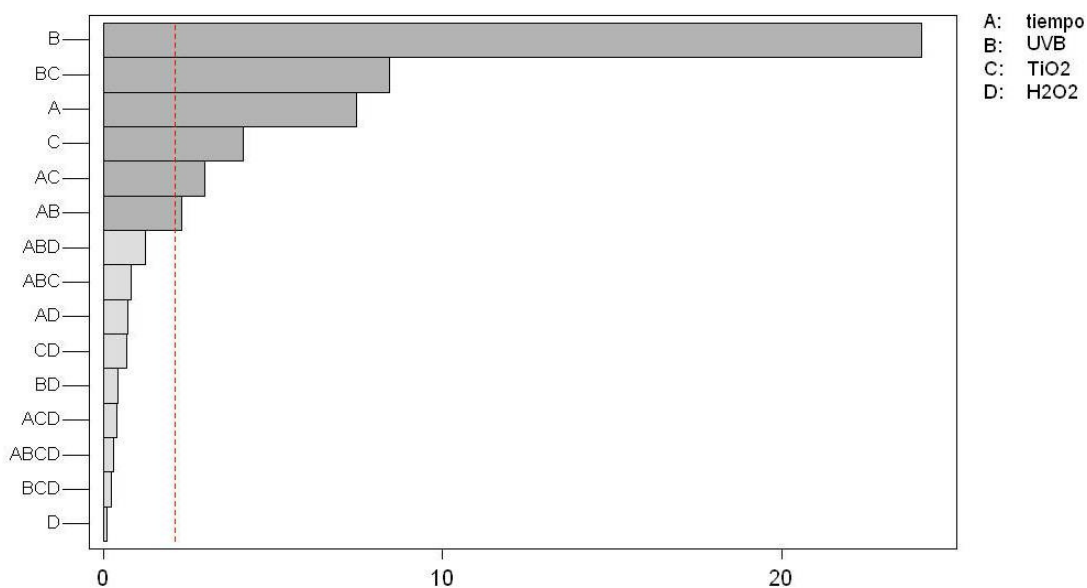


Figura 5.25. Diagrama de Pareto en el que se muestran los efectos significativos sobre el factor respuesta *Enterococcus* sp.

Los efectos que se extienden más allá de la línea de referencia son significativos en el nivel predeterminado de  $\alpha=0,05$ . Por tanto, el diagrama muestra seis variables e interacciones que influyen sobre la respuesta de inactivación de una manera



significativa: la radiación UVB, la interacción [radiación UVB][TiO<sub>2</sub>], el tiempo, la interacción [tiempo][TiO<sub>2</sub>], el TiO<sub>2</sub> y la interacción [tiempo][radiación UVB].

En vista de los resultados obtenidos, donde no se percibe bien la influencia de las variables TiO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> debido al gran efecto de la radiación UVB, se realiza un nuevo análisis excluyendo la variable radiación UVB. En este caso, van a ser tres las variables a tener en cuenta: el tiempo, el TiO<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La Figura 5.26 refleja los efectos de cada una de las variables planteadas sobre la inactivación de *Enterococcus* sp. El efecto de las variables tiempo y TiO<sub>2</sub> son importantes de manera positiva sobre el factor respuesta, pues la pendiente de sus rectas es muy pronunciada, mientras que el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vuelve a tener poca relevancia sobre la inactivación bacteriana y además, muestra un efecto negativo. Por tanto, se pone de manifiesto los bajos resultados de inactivación obtenidos sobre las poblaciones iniciales de *Enterococcus* sp. con el tratamiento irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\lambda$ : 320-800nm) (Figura 5.18).

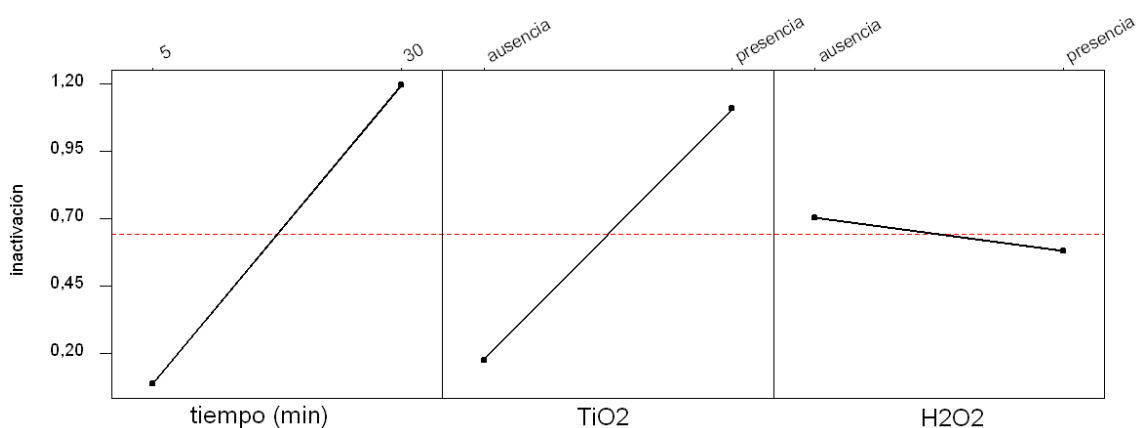


Figura 5.26. Influencia de las variables seleccionadas (sin radiación UVB) en los procesos de radiación solar sobre *Enterococcus* sp.

La Figura 5.27 representa la interacción entre las variables seleccionadas, siendo la más importante la interacción [tiempo][TiO<sub>2</sub>], observándose un mayor efecto de la presencia de TiO<sub>2</sub> a un tiempo de tratamiento más prolongado.

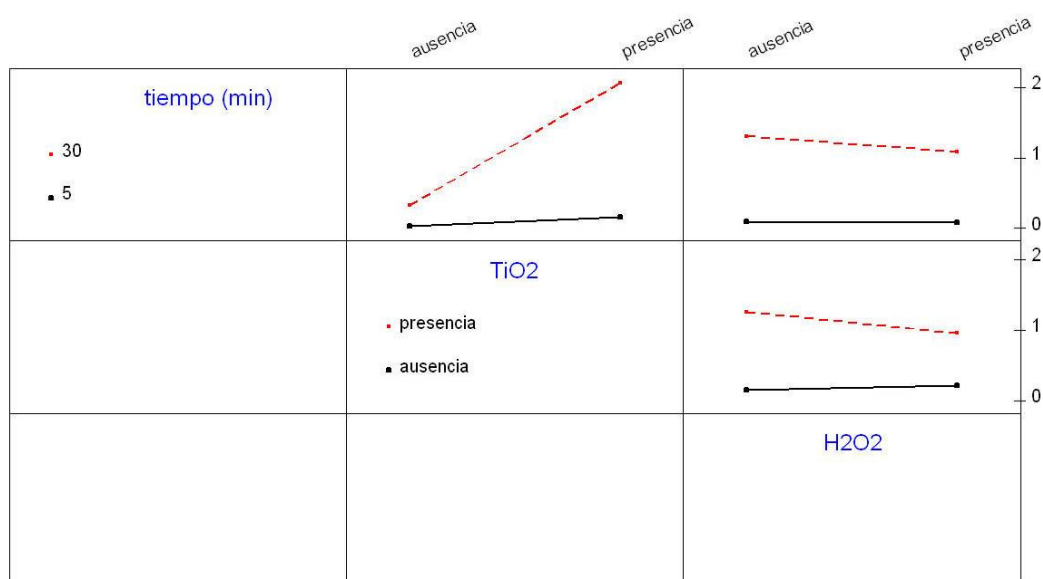


Figura 5.27. Representación gráfica de las interacciones entre variables (sin radiación UVB) sobre *Enterococcus* sp.

Por último, para conocer qué variables e interacciones son significativas en la inactivación de *Enterococcus* sp. en el rango 320-800 nm, se representa en la Figura 5.28 el diagrama de Pareto. Éste muestra tres variables e interacciones que influyen sobre la respuesta de inactivación de una manera significativa: el tiempo y el  $\text{TiO}_2$ .

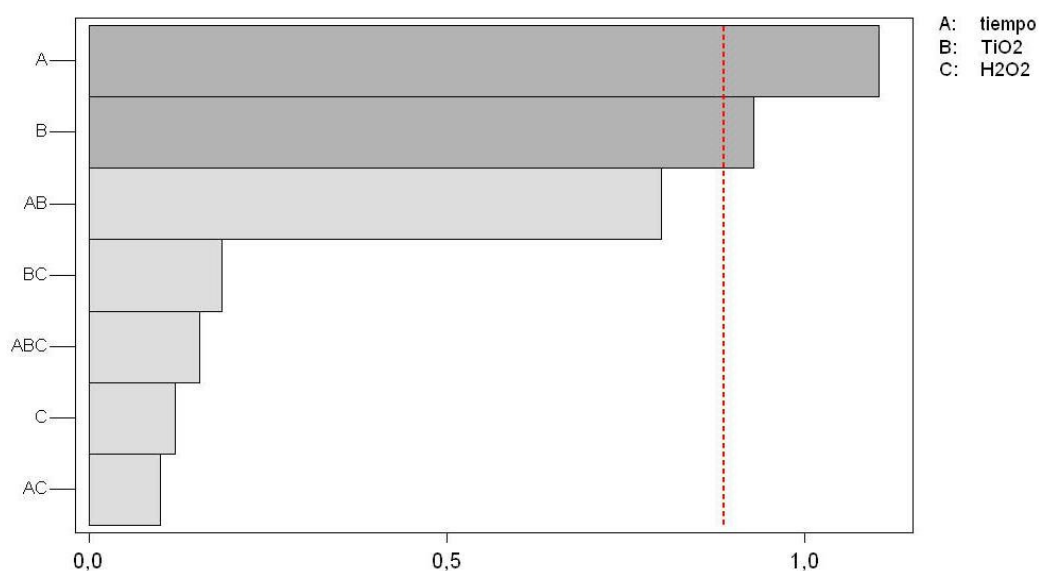


Figura 5.28. Diagrama de Pareto en el que se muestran los efectos significativos (sin radiación UVB) sobre el factor respuesta *Enterococcus* sp.

### 5.2.3. Modelización cinética

Los datos experimentales de las curvas de inactivación de las células vegetativas y esporos de *C. perfringens* y de *Enterococcus* sp. obtenidos durante los tratamientos de irradiación, irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fotocátalisis y fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se analizan a través de 3 modelos matemáticos, el modelo de Hom, el modelo bifásico y el modelo de Mafart.

Dos de los tres modelos utilizados coinciden con los modelos seleccionados para el tratamiento de cloración; sin embargo, se ha sustituido el modelo de Hom modificado, utilizado en la etapa de cloración, por el modelo de Hom debido a las condiciones operacionales de los ensayos. La irradiación de luz solar se aplica de manera constante a la muestra a lo largo del experimento por lo que no se produce una disminución de la concentración del agente desinfectante, tal y como establece el modelo de Hom. En el apartado 3.4.3 de la presente memoria se desarrollan con más detalle cada uno de estos modelos.

Las Tablas 5.11, 5.12, 5.13 y 5.14 muestran los valores de los parámetros cinéticos obtenidos al aplicar los modelos matemáticos seleccionados sobre las curvas de inactivación de células vegetativas y esporos de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp. durante los tratamientos de irradiación, fotocátalisis, irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a  $\lambda > 320$  nm.

Los valores de los índices de ajuste, ECM y R<sup>2</sup>, muestran que los modelos matemáticos se ajustan bien a las curvas de inactivación obtenidas sobre las células vegetativas y esporos de *C. perfringens*. Con respecto a *Enterococcus* sp., salvo en el tratamiento fotocátalisis, el resto de tratamientos no muestran un ajuste bueno. Los valores de R<sup>2</sup> están por debajo de 0,95. A este hecho se suma que el modelo bifásico no se ajusta a las curvas de inactivación de *Enterococcus* sp. pues muestran una tendencia de inactivación prácticamente lineal, por lo que no se diferencian poblaciones con diferentes resistencias al tratamiento.

Tabla 5.11. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de las tres formas bacterianas de estudio en el tratamiento de irradiación ( $\lambda$ : 320-800 nm).

Modelo de Hom					
	$k_{ap}$ ( $\text{min}^{-1} \cdot \text{W m}^{-2}$ )	$m$		ECM	$R^2$
células vegetativas	0,28	1,11		0,0001	0,94
esporos	0,0007	1,64		0,0008	0,99
<i>Enterococcus</i> sp.	0,003	1,28		0,019	0,94
Modelo bifásico					
	$P$	$k_1$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_2$ ( $\text{min}^{-1}$ )	ECM	$R^2$
células vegetativas	0,9538	0,82	0	0,07	0,98
esporos	---	---	---	---	---
<i>Enterococcus</i> sp.	---	---	---	---	---
Modelo de Mafart					
	$p$	$\delta$ (min)		ECM	$R^2$
células vegetativas	0,74	3,66		0,08	0,98
esporos	1,62	82,95		0,001	0,99
<i>Enterococcus</i> sp.	1,36	83,65		0,02	0,94

Tabla 5.12. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de las tres formas bacterianas de estudio en el tratamiento de fotocátalisis ( $\lambda$ : 320-800 nm).

Modelo de Hom					
	$k_{ap}$ ( $\text{min}^{-1} \cdot \text{W m}^{-2}$ )	$m$		ECM	$R^2$
células vegetativas	1,688	0,80		0,33	0,97
esporos	0,250	0,46		0,08	0,96
<i>Enterococcus</i> sp.	0,049	1,13		0,08	0,98
Modelo bifásico					
	$P$	$k_1$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_2$ ( $\text{min}^{-1}$ )	ECM	$R^2$
células vegetativas	0,9960	4,27	1,71	0,32	0,99
esporos	0,6810	2,48	0,06	0,12	0,98
<i>Enterococcus</i> sp.	---	---	---	---	---
Modelo de Mafart					
	$p$	$\delta$ (min)		ECM	$R^2$
células vegetativas	0,75	0,43		0,45	0,97
esporos	0,47	20,11		0,13	0,96
<i>Enterococcus</i> sp.	1,10	13,47		0,11	0,98

Tabla 5.13. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de las tres formas bacterianas de estudio en el tratamiento de irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\lambda$ : 320-800 nm).

Modelo de Hom					
	$k_{ap}$ (min <sup>-1</sup> · W m <sup>-2</sup> )	m		ECM	R <sup>2</sup>
células vegetativas	4,323	0,42		0,30	0,98
esporos	1,03	0,04		0,05	0,98
<i>Enterococcus</i> sp.	0,0002	2,17		0,04	0,90
Modelo bifásico					
	P	$k_1$ (min <sup>-1</sup> )	$k_2$ (min <sup>-1</sup> )	ECM	R <sup>2</sup>
células vegetativas	0,99995	8,84	1,65	0,80	0,97
esporos	0,9337	0,73	0	0,06	0,99
<i>Enterococcus</i> sp.	---	---	---	---	---
Modelo de Mafart					
	p	$\delta$ (min)		ECM	R <sup>2</sup>
células vegetativas	0,42	0,03		0,30	0,98
esporos	0,04	0,47		0,08	0,98
<i>Enterococcus</i> sp.	2,28	46,38		0,05	0,90

Tabla 5.14. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de las tres formas bacterianas de estudio en el tratamiento de fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\lambda$ : 320-800 nm).

Modelo de Hom					
	$k_{ap}$ (min <sup>-1</sup> · W m <sup>-2</sup> )	m		ECM	R <sup>2</sup>
células vegetativas	3,21	0,52		0,51	0,95
esporos	0,874	0,06		0,02	0,99
<i>Enterococcus</i> sp.	0,087	0,90		0,14	0,95
Modelo bifásico					
	P	$k_1$ (min <sup>-1</sup> )	$k_2$ (min <sup>-1</sup> )	ECM	R <sup>2</sup>
células vegetativas	0,999991	5,73	0,73	0,46	0,98
esporos	0,9010	0,84	0,01	0,06	0,99
<i>Enterococcus</i> sp.	---	---	---	---	---
Modelo de Mafart					
	p	$\delta$ (min)		ECM	R <sup>2</sup>
células vegetativas	0,52	0,11		0,51	0,95
esporos	0,06	8,88		0,04	0,99
<i>Enterococcus</i> sp.	0,86	13,77		0,19	0,95

Si se comparan los valores de los parámetros cinéticos obtenidos para cada una de las formas bacterianas entre los diferentes tratamientos aplicados se observa que, para el caso de las células vegetativas de *C. perfringens*, los valores de las constantes de inactivación calculadas ( $k_{ap}$  en el modelo de Hom y  $k_1$  y  $k_2$  en el modelo bifásico) en el tratamiento de irradiación (Tabla 5.11) son muy inferiores a las obtenidas con respecto al tratamiento fotocatalítico (Tabla 5.12) y éstas a su vez, inferiores a las obtenidas para los tratamientos de irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que son los tratamientos más eficaces en la desinfección de las muestras con células vegetativas. Estos resultados también se observan respecto al parámetro  $\delta$  del modelo de Mafart, pero en este caso su valor es mayor en la irradiación que en el resto de tratamientos, pues tarda más tiempo en conseguir una unidad logarítmica de inactivación.

Estas mismas conclusiones se observan sobre los esporos de *C. perfringens*, observándose valores superiores en las constantes de inactivación ( $k_{ap}$  en el modelo de Hom y  $k_1$  y  $k_2$  en el modelo bifásico) en los tratamientos de fotocátalisis, irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con respecto al tratamiento de irradiación. En esta misma línea, el valor del parámetro  $\delta$  es muy superior en el tratamiento de irradiación con respecto a los otros tratamientos, por ser el menos eficaz en la inactivación de las poblaciones esporuladas.

Finalmente, en relación al tercer indicador bacteriano *Enterococcus* sp. se vuelven a cumplir las conclusiones derivadas de *C. perfringens*. En este caso las constantes de inactivación del modelo de Hom ( $k_{ap}$ ) son muy inferiores en los tratamientos de irradiación e irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con respecto a las obtenidas para la fotocátalisis y fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De la misma manera, los valores del parámetro  $\delta$  del modelo de Mafart son muy superiores en los primeros tratamientos con respecto a los dos últimos.

La Tabla 5.15 recoge los mismos parámetros cinéticos sobre las curvas de inactivación de *Enterococcus* sp. durante los tratamientos de irradiación, fotocátalisis, irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pero a  $\lambda > 290$  nm. En primer lugar se observa que se ha podido aplicar el modelo bifásico sobre los resultados de inactivación obtenidos. También se deriva bajo estas condiciones de operación que las constantes de inactivación ( $k_{ap}$  en el modelo de Hom y  $k_1$  y  $k_2$  en el modelo bifásico) son superiores

en los tratamientos de irradiación e irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por ser más efectivos en la inactivación de las poblaciones de *Enterococcus* sp. De la misma manera, los valores del parámetro  $\delta$  son mucho más bajos para los dos primeros tratamientos, alcanzando la unidad logarítmica de inactivación en los primeros segundos de tratamiento.

Tabla 5.15. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de *Enterococcus* sp. en los tratamientos de irradiación, fotocatálisis, irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y fotocatálisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\lambda$ : 290-800 nm).

Modelo de Hom					
	$k_{ap}$ ( $\text{min}^{-1} \cdot \text{W m}^{-2}$ )	$m$	ECM	$R^2$	
Irradiación	4,818	0,14	0,21	0,99	
Irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4,388	0,18	0,13	0,99	
Fotocatálisis	2,385	0,23	0,21	0,98	
Fotocatálisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,764	0,36	0,34	0,96	
Modelo bifásico					
	$P$	$k_1$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_2$ ( $\text{min}^{-1}$ )	ECM	$R^2$
Irradiación	0,999996	8,87	0,20	0,51	0,97
Irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,999997	9,96	0,23	0,35	0,98
Fotocatálisis	0,9995	3,29	0,15	0,33	0,97
Fotocatálisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,99990	1,34	0,12	0,26	0,99
Modelo de Mafart					
	$p$	$\delta$ (min)	ECM	$R^2$	
Irradiación	0,14	0,000013	0,21	0,99	
Irradiación/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,18	0,00036	0,13	0,99	
Fotocatálisis	0,23	0,023	0,21	0,98	
Fotocatálisis/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,36	0,212	0,34	0,96	

Comparando los valores de los parámetros obtenidos en la inactivación de *Enterococcus* sp. a longitudes de onda superiores a 320 nm (Tabla 5.13) con los obtenidos a longitudes de onda superiores a 290 nm (Tabla 5.14), se deriva que las constantes de velocidad de inactivación presentan valores mayores a  $\lambda > 290$  nm, por ser tratamientos más efectivos en la desinfección al contener la radiación UVB, y en consecuencia, presentan tiempos menores para alcanzar una unidad logarítmica de inactivación ( $\delta$  menores).

Las Figuras 5.29, 5.30, 5.31 reflejan el ajuste de los modelos aplicados sobre las curvas de inactivación de las células vegetativas y esporos de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp., respectivamente, con los cuatro tratamientos de irradiación estudiados ( $\lambda > 320$  nm). Paralelamente, la Figura 5.32 muestra el ajuste de los modelos sobre *Enterococcus* sp. con los mismos tratamientos pero con diferente rango de irradiación ( $\lambda > 290$  nm).

Finalmente, las Figuras 5.33 a 5.47 muestran el ajuste de los modelos matemáticos aplicados sobre las curvas de inactivación obtenidas sobre los esporos y células vegetativas de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp., enfrentando los valores logarítmicos de inactivación observados frente a los valores logarítmicos de inactivación estimados. Cuanto más cerca esté la distribución de la nube de puntos a la recta, mejor se ajusta el modelo aplicado a los datos experimentales.



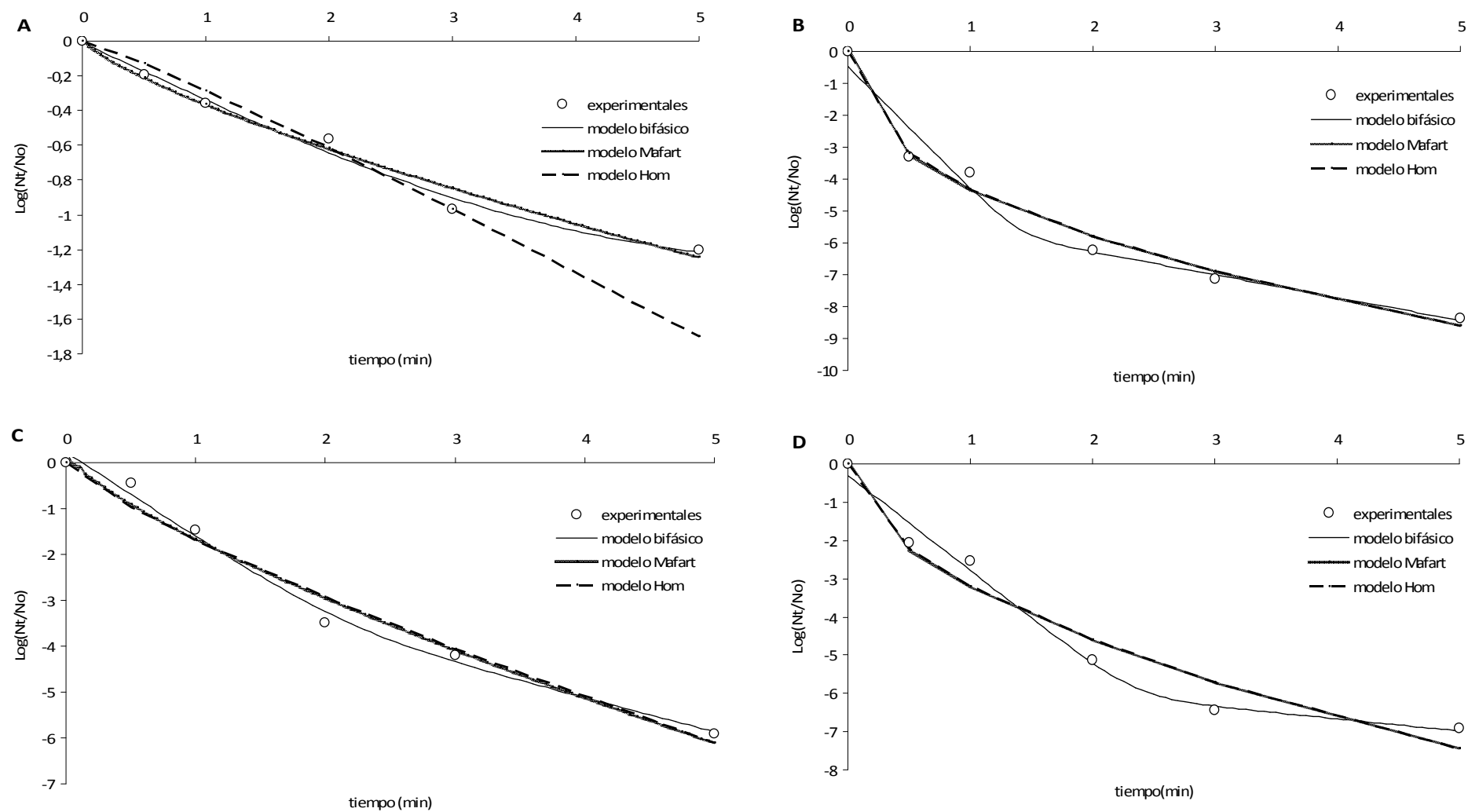


Figura 5.29. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de *C. perfringens* mediante los tratamientos de irradiación (A), irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B), fotocatalísis (C) y fotocatalísis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (D).  $\lambda$  320-800 nm.

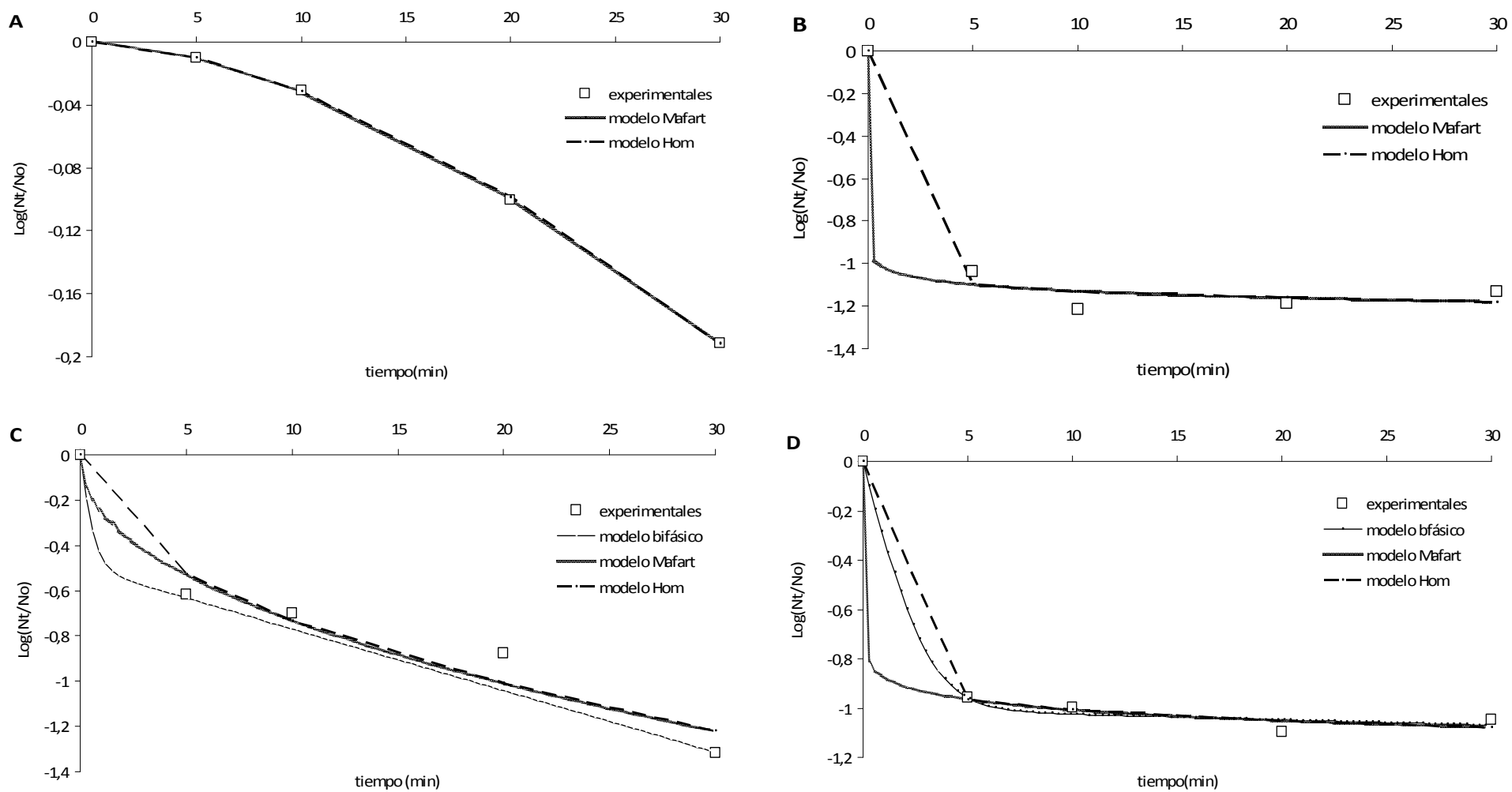


Figura 5.30. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de esporos de *C. perfringens* mediante los tratamientos de irradiación (A), irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B), fotocatalisis (C) y fotocatalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (D).  $\lambda$  320-800 nm.

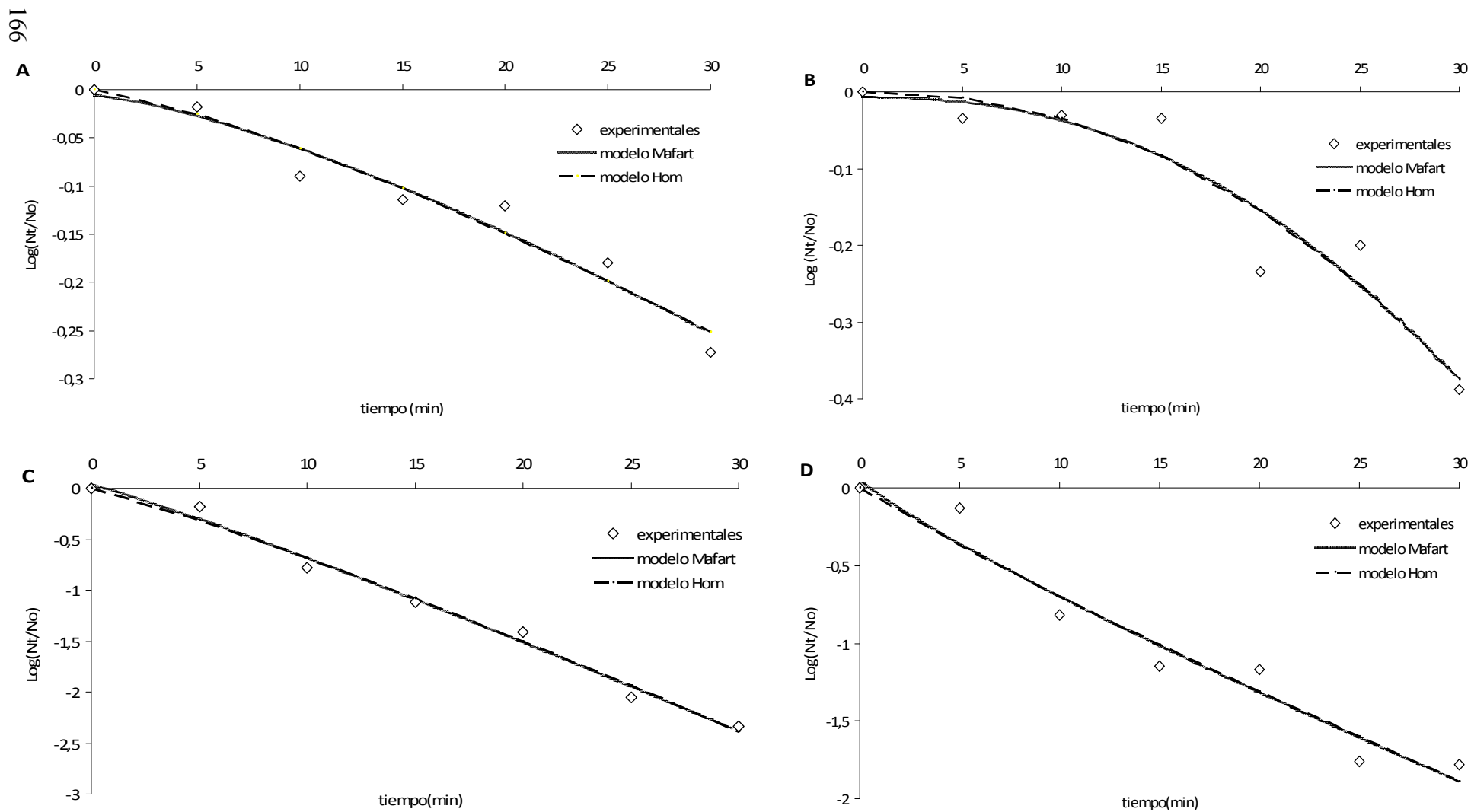


Figura 5.31. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de *Enterococcus* sp. mediante los tratamientos de irradiación (A), irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B), fotocátalisis (C) y fotocátalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (D).  $\lambda$  320-800 nm.

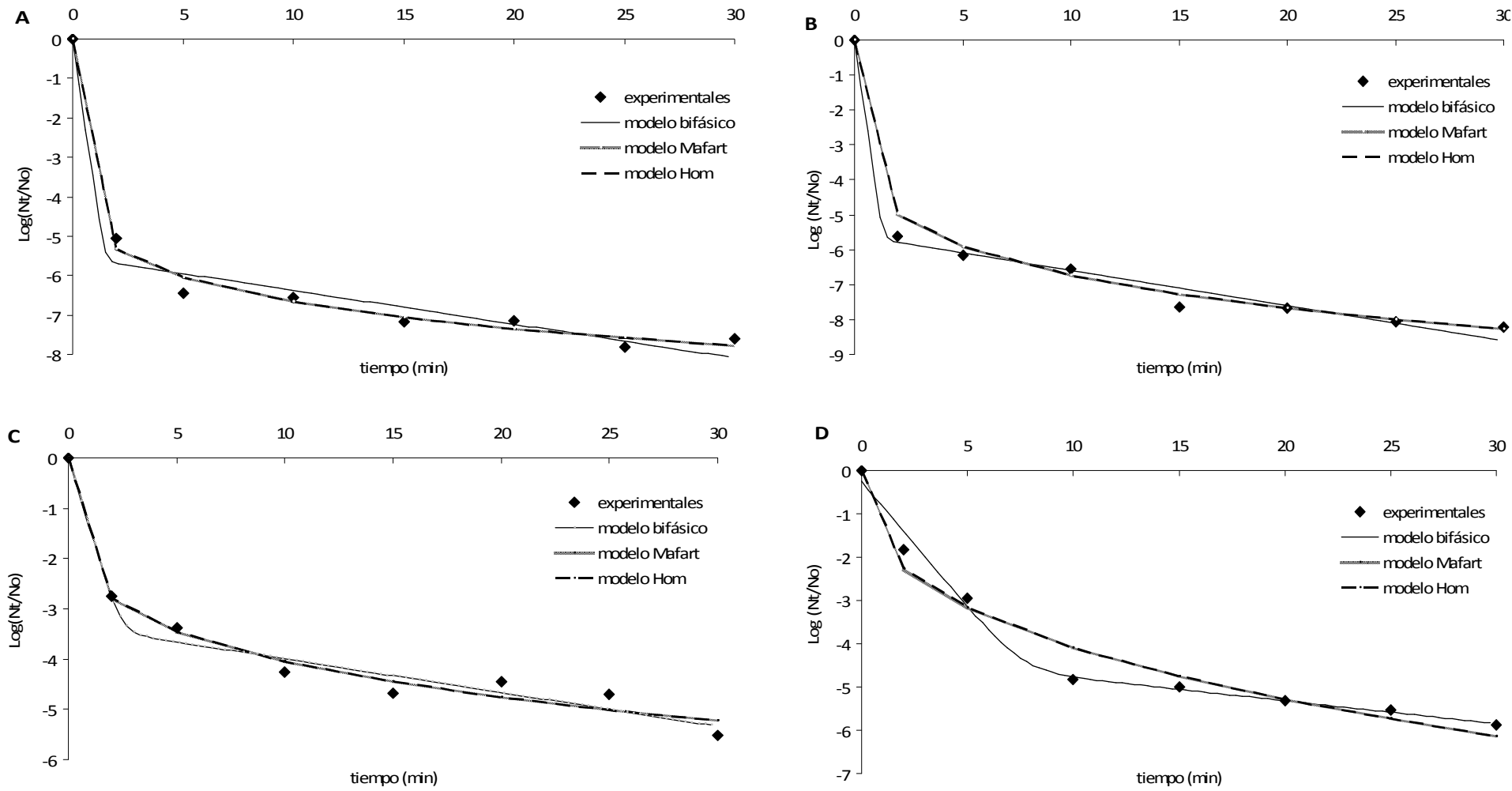


Figura 5.32. Ajuste de los tres modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de *Enterococcus* sp. mediante los tratamientos de irradiación (A), irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B), fotocatalísis (C) y fotocatalísis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (D).  $\lambda$  290-800 nm.

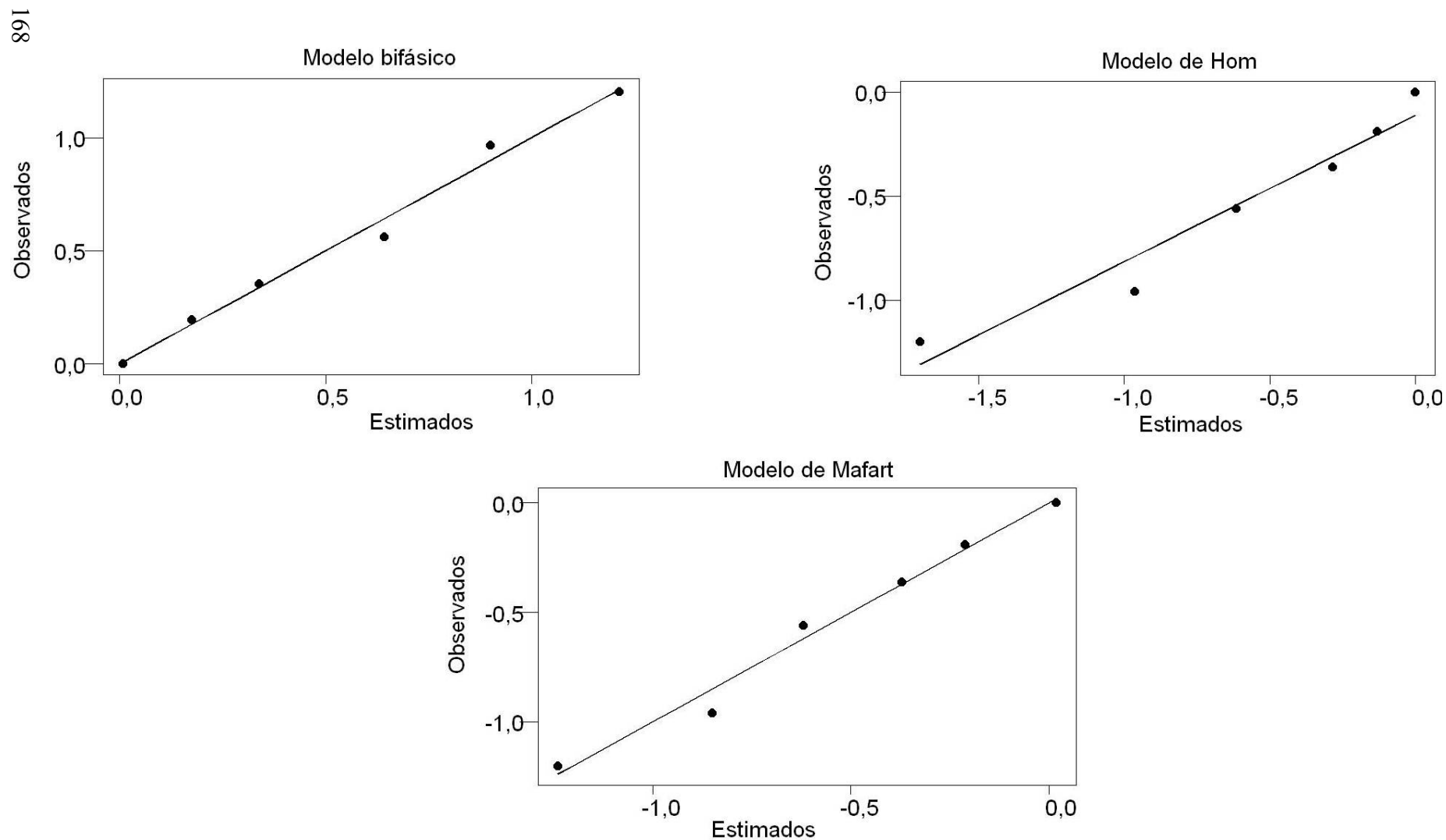


Figura 5.33. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica observada experimentalmente y la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados sobre las células vegetativas de *C. perfringens* mediante tratamiento de irradiación.  $\lambda$  320-800 nm.

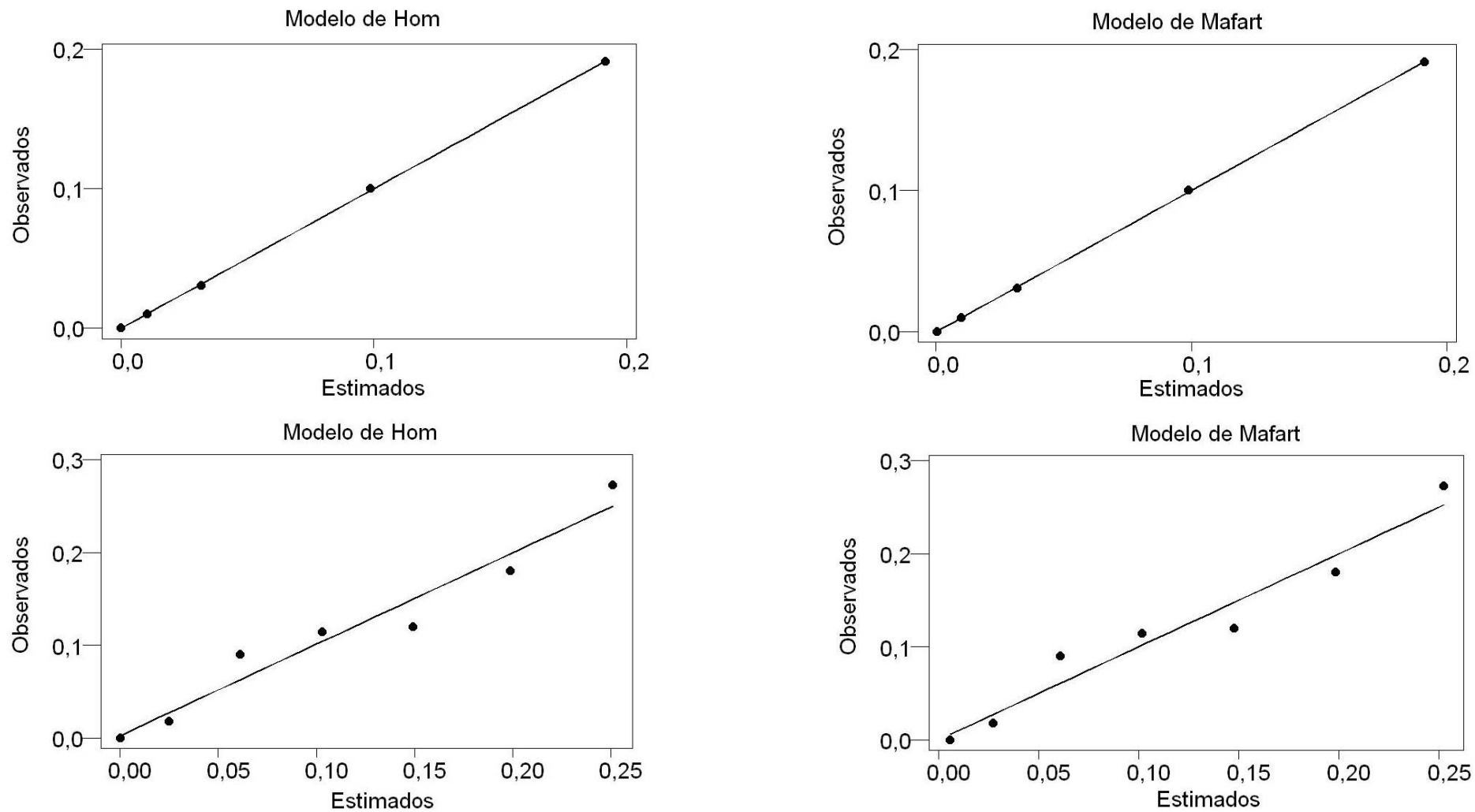


Figura 5.34. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica observada experimentalmente y la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados sobre los esporos (arriba) y *Enterococcus* sp. (abajo) mediante tratamiento de irradiación.  $\lambda$  320-800 nm.

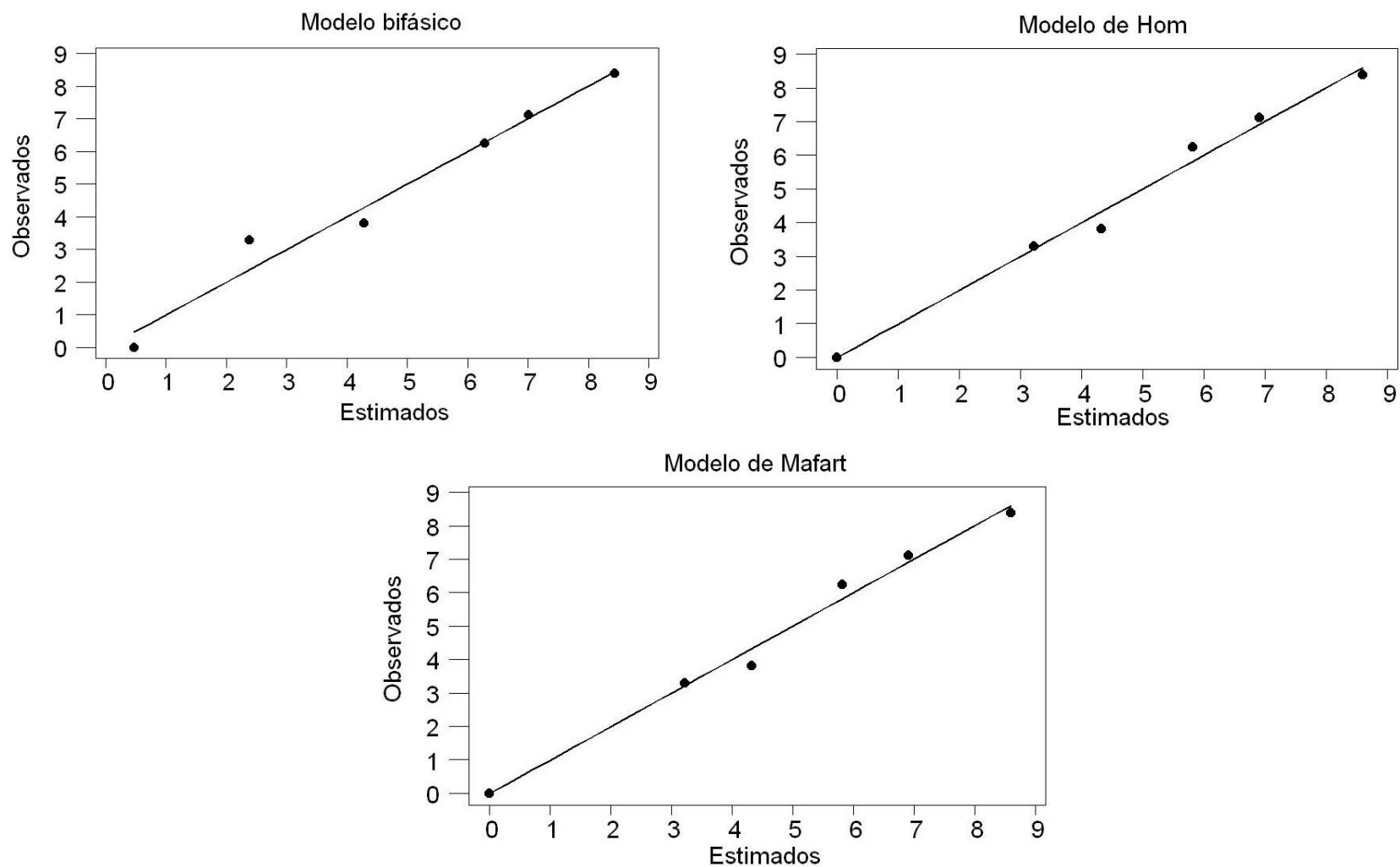


Figura 5.35. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica observada experimentalmente y la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados sobre las células vegetativas de *C. perfringens* mediante tratamiento de irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.  $\lambda$  320-800 nm.

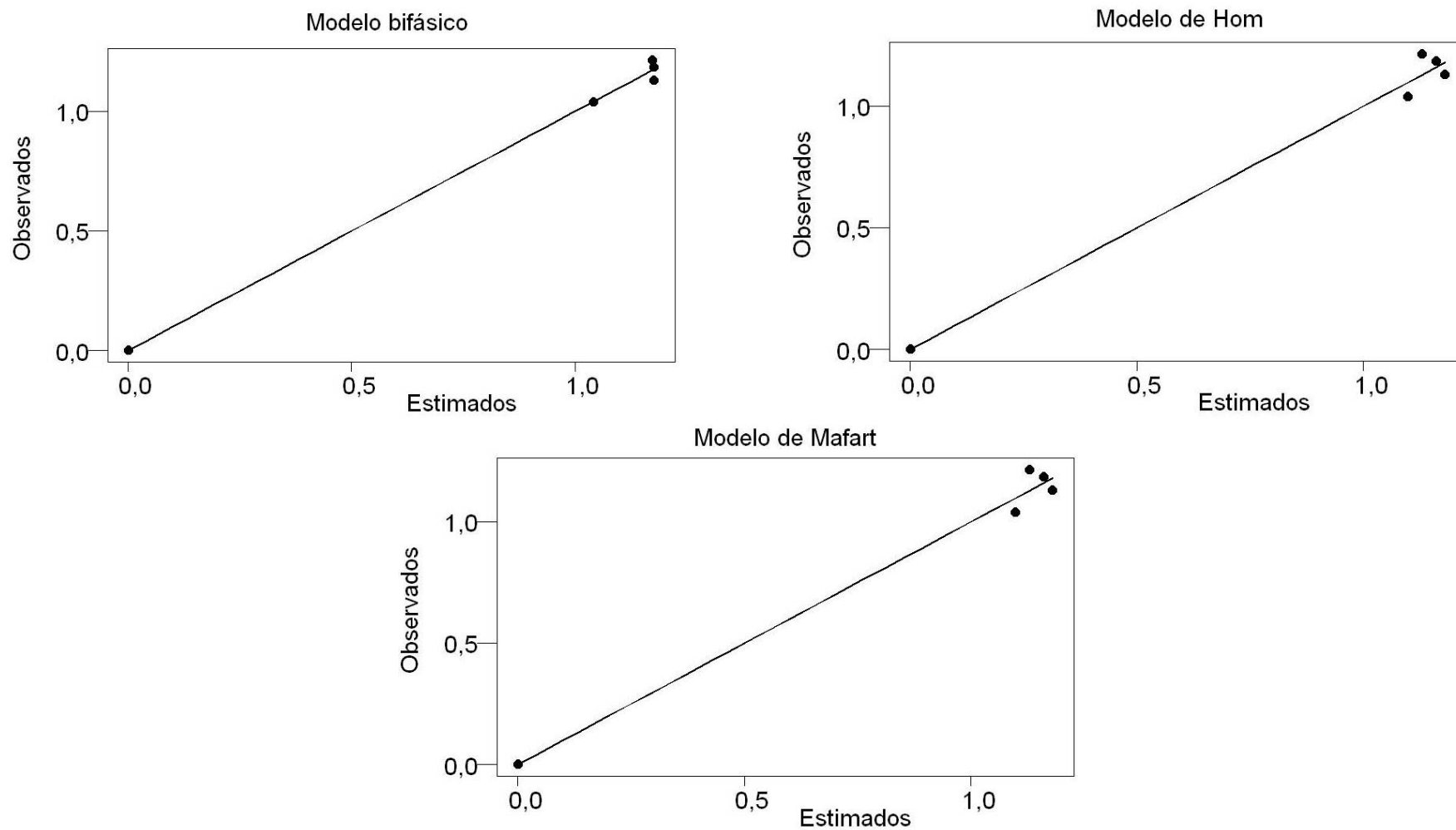


Figura 5.36. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica observada experimentalmente y la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados sobre los esporos de *C. perfringens* mediante tratamiento de irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.  $\lambda$  320-800 nm.



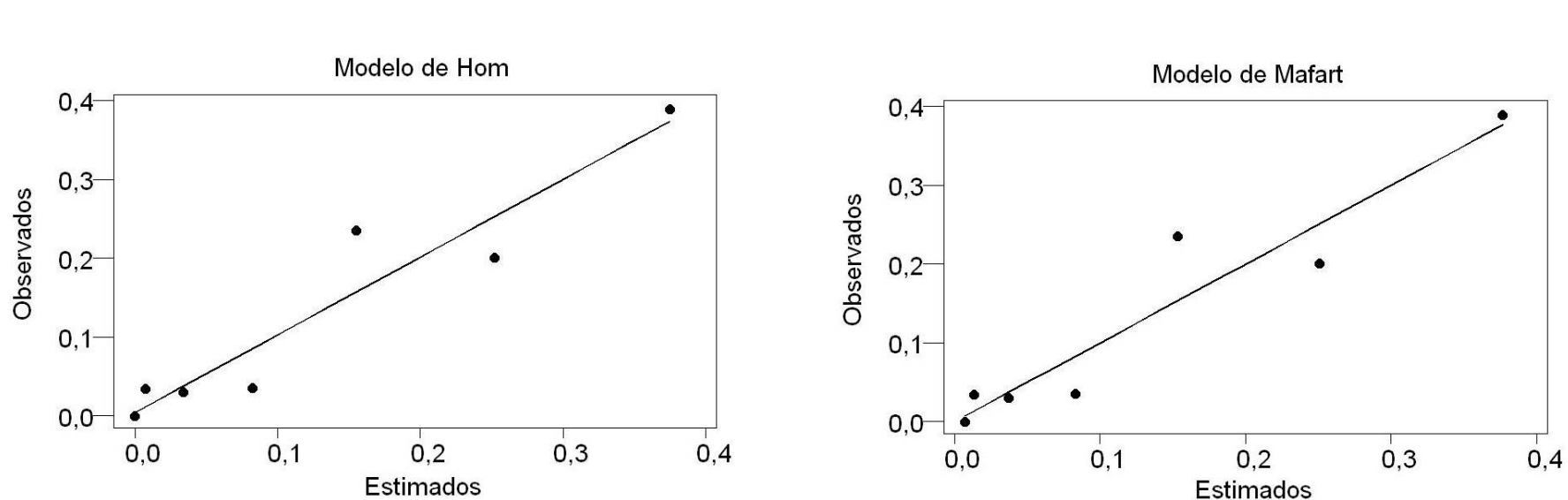


Figura 5.37. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica observada experimentalmente y la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados sobre *Enterococcus* sp. mediante tratamiento de irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.  $\lambda$  320-800 nm.

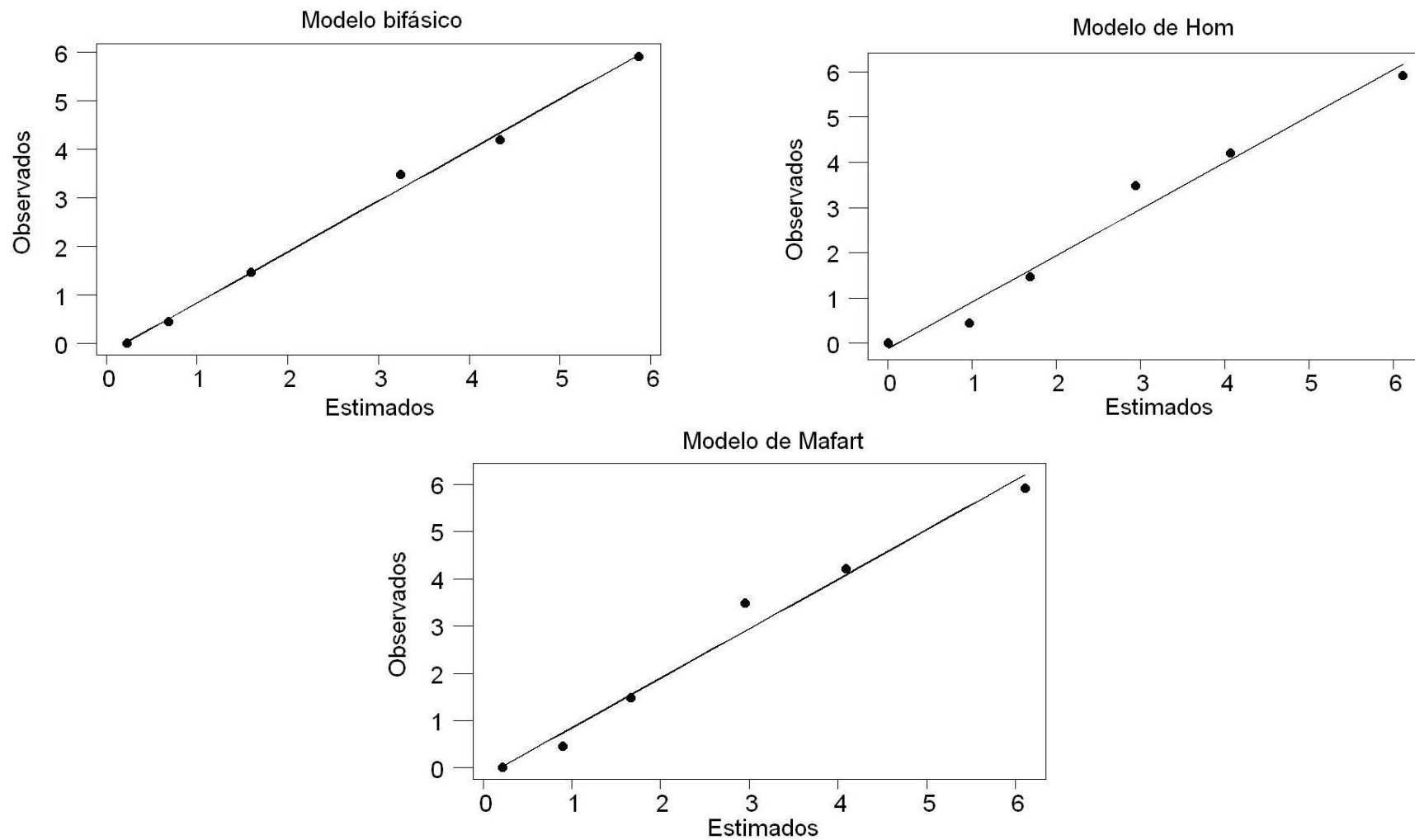


Figura 5.38. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de las células vegetativas de *C. perfringens* en el tratamiento de fotocatalisis.  $\lambda$  320-800 nm.

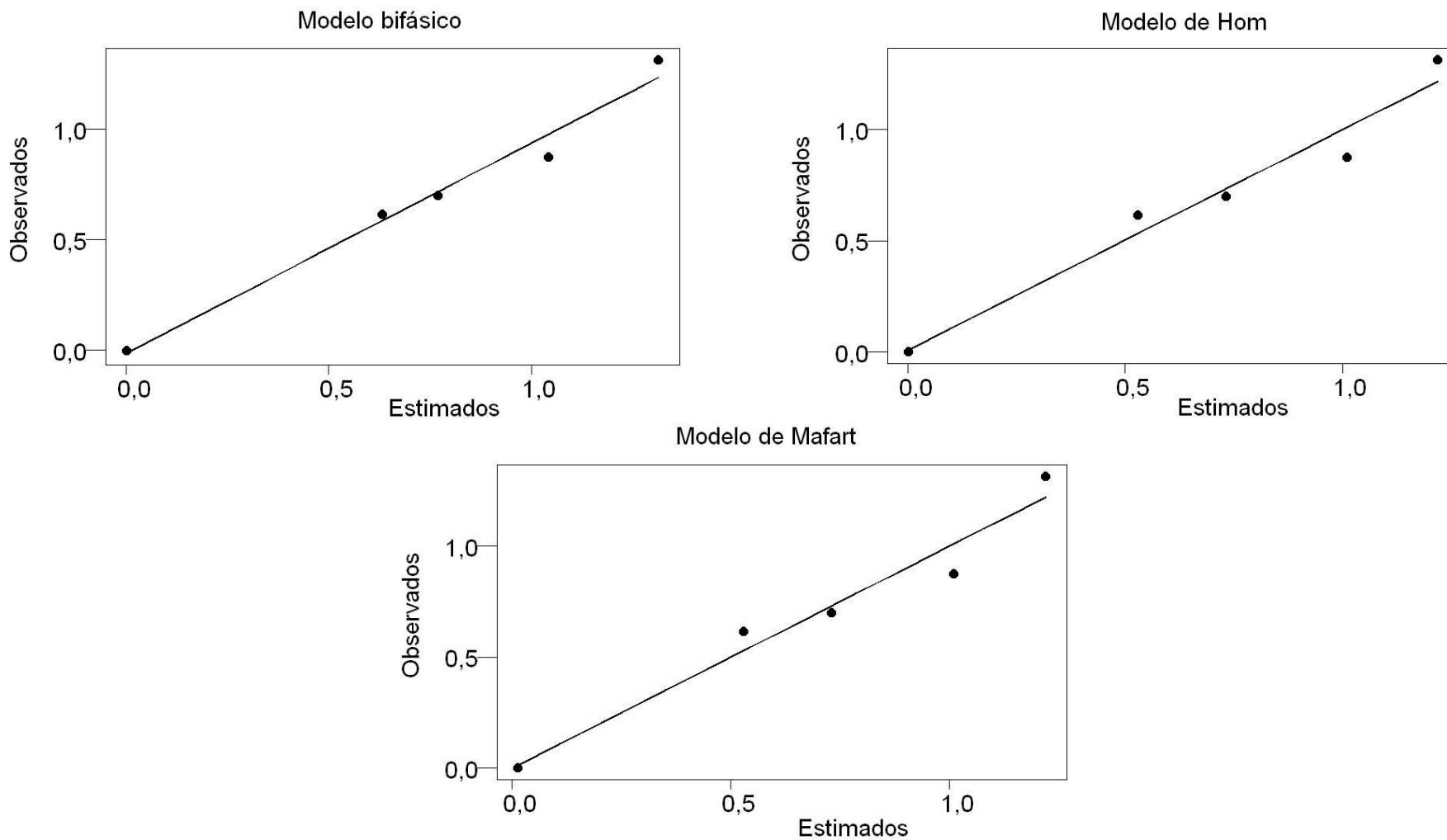


Figura 5.39. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de las células vegetativas de esporos en el tratamiento de fotocátalisis.  $\lambda$  320-800 nm.

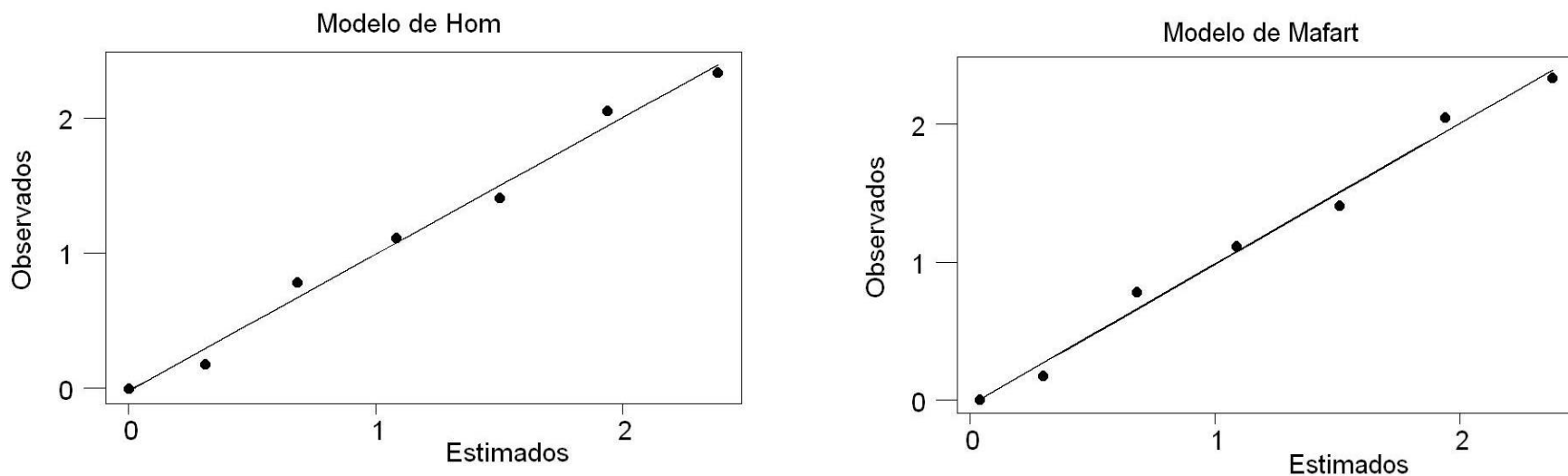


Figura 5.40. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de fotocatalisis.  $\lambda$  320-800 nm.

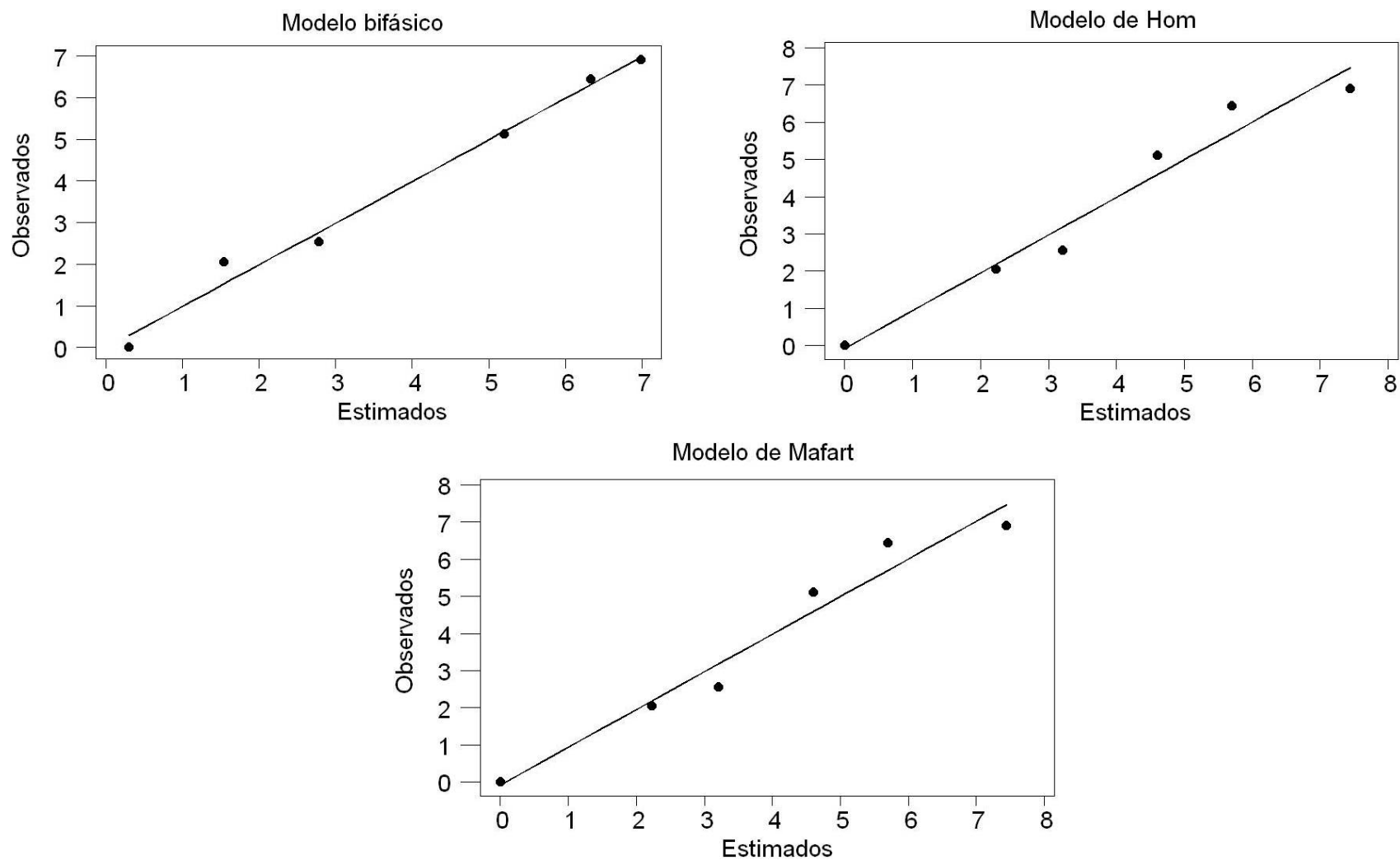


Figura 5.41. Representación de la correlación entre la inactivación logarítmica observada experimentalmente y la inactivación logarítmica calculada por los modelos cinéticos aplicados sobre las células vegetativas de *C. perfringens* en el tratamiento de fotocatalisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.  $\lambda$ : 320-800 nm.

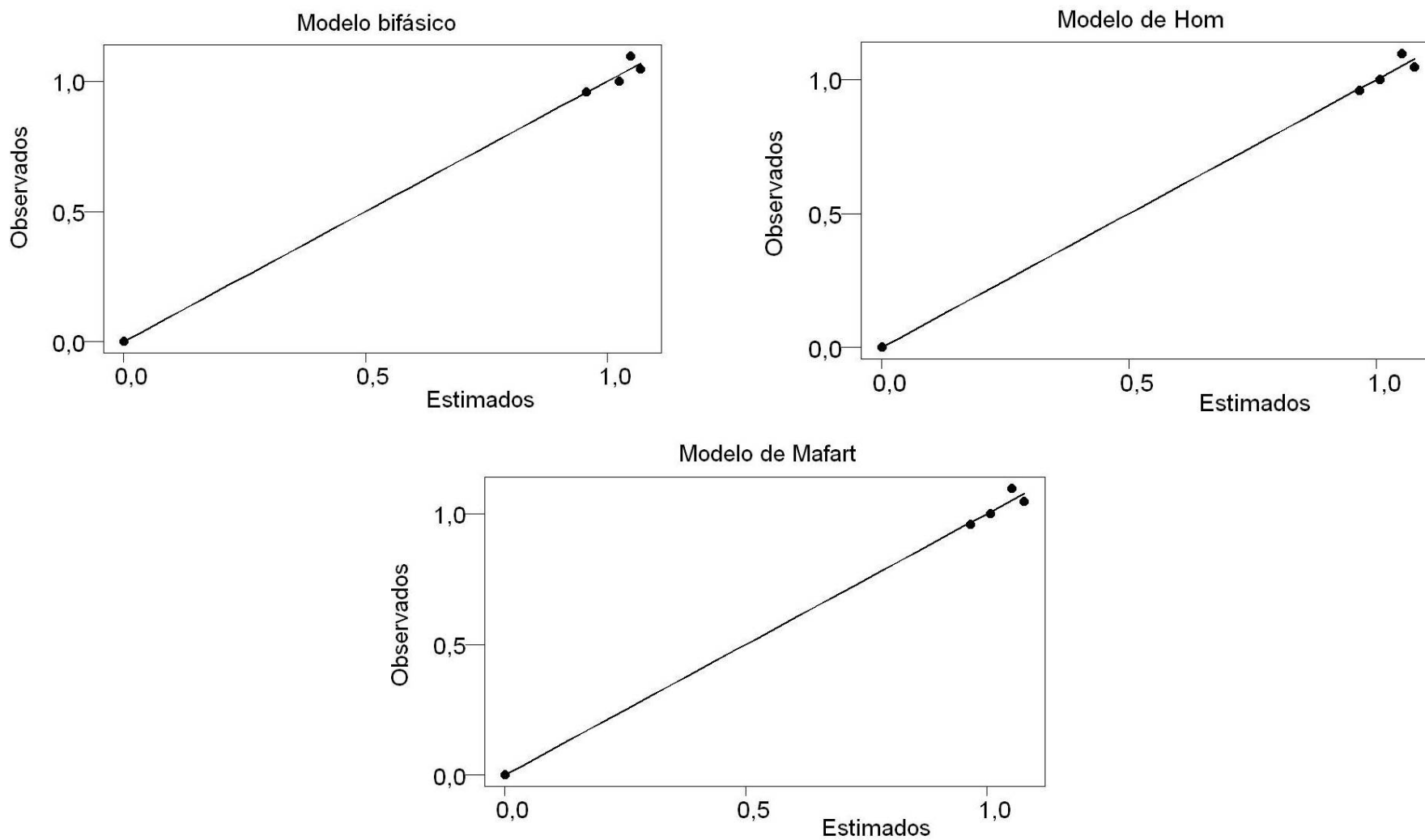


Figura 5.42. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de esporos en el tratamiento de fotocátalisis/ $\text{H}_2\text{O}_2$ .  $\lambda$  320-800 nm.

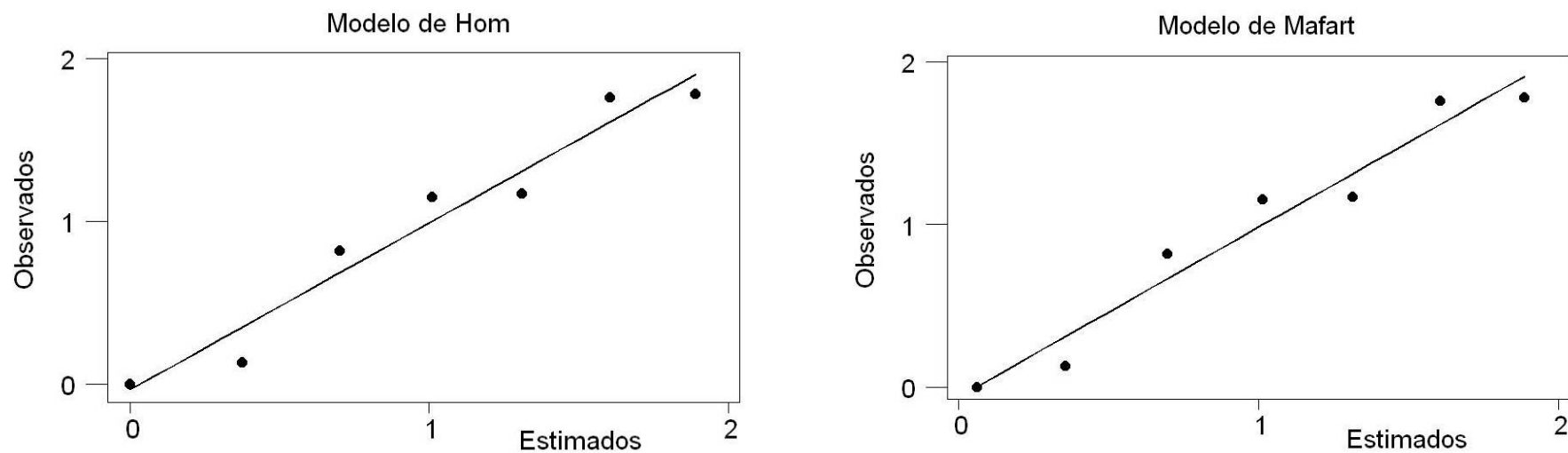


Figura 5.43. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de fotocátalisis/ $\text{H}_2\text{O}_2$ .  $\lambda$  320-800 nm.

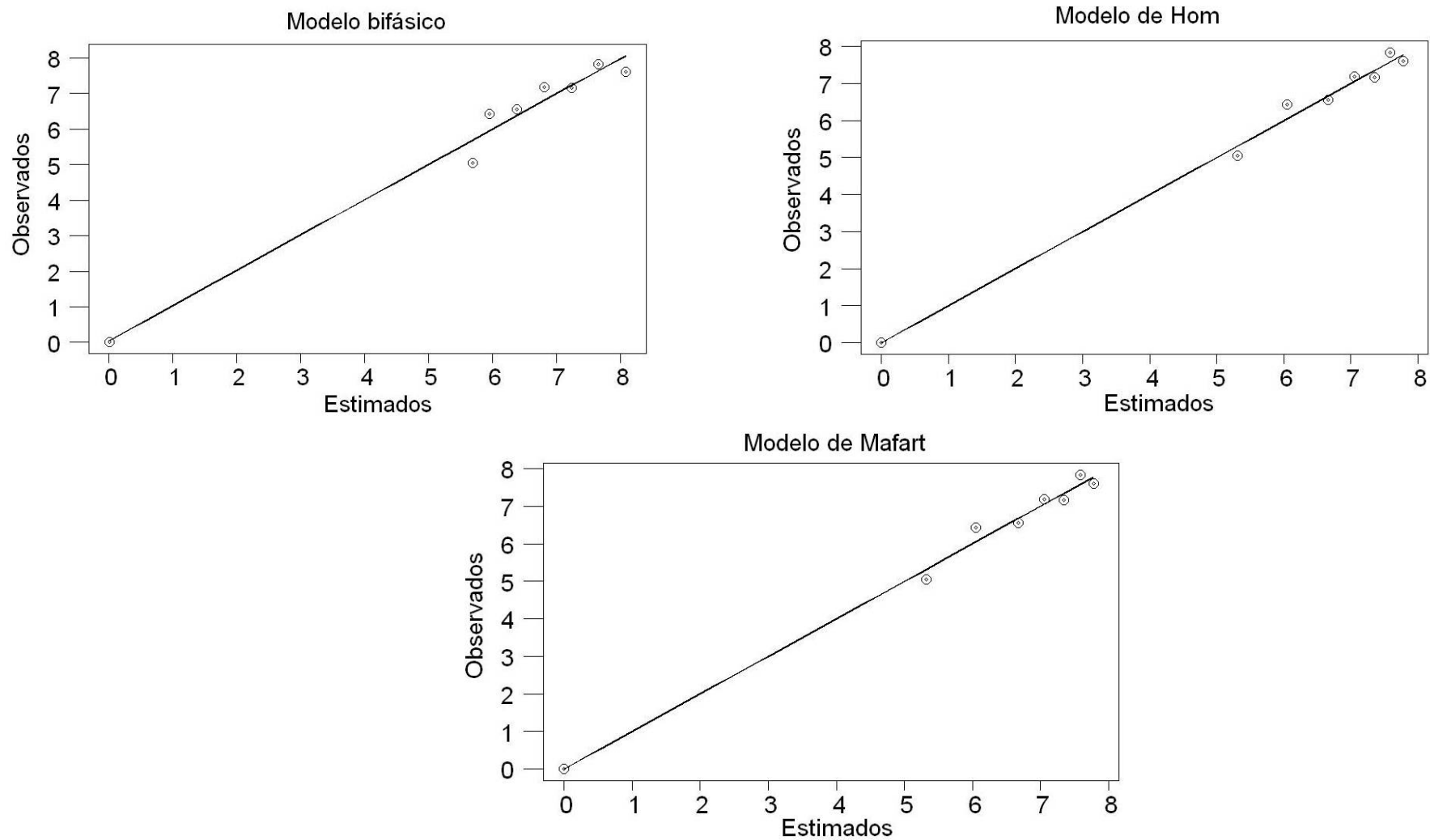


Figura 5.44. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de irradiación.  $\lambda$  290-800 nm.



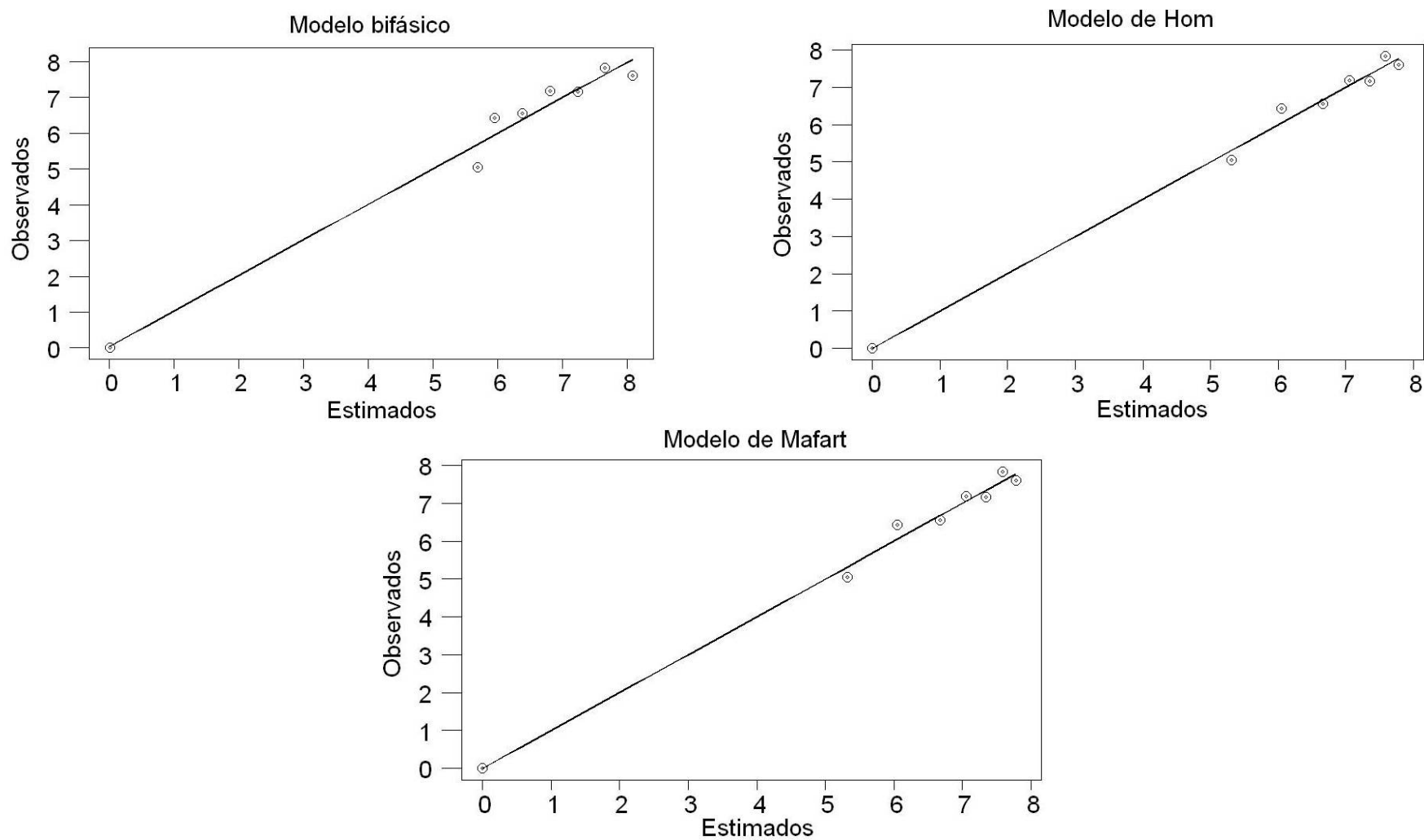


Figura 5.45. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de irradiación/ $\text{H}_2\text{O}_2$   $\lambda$  290-800 nm.

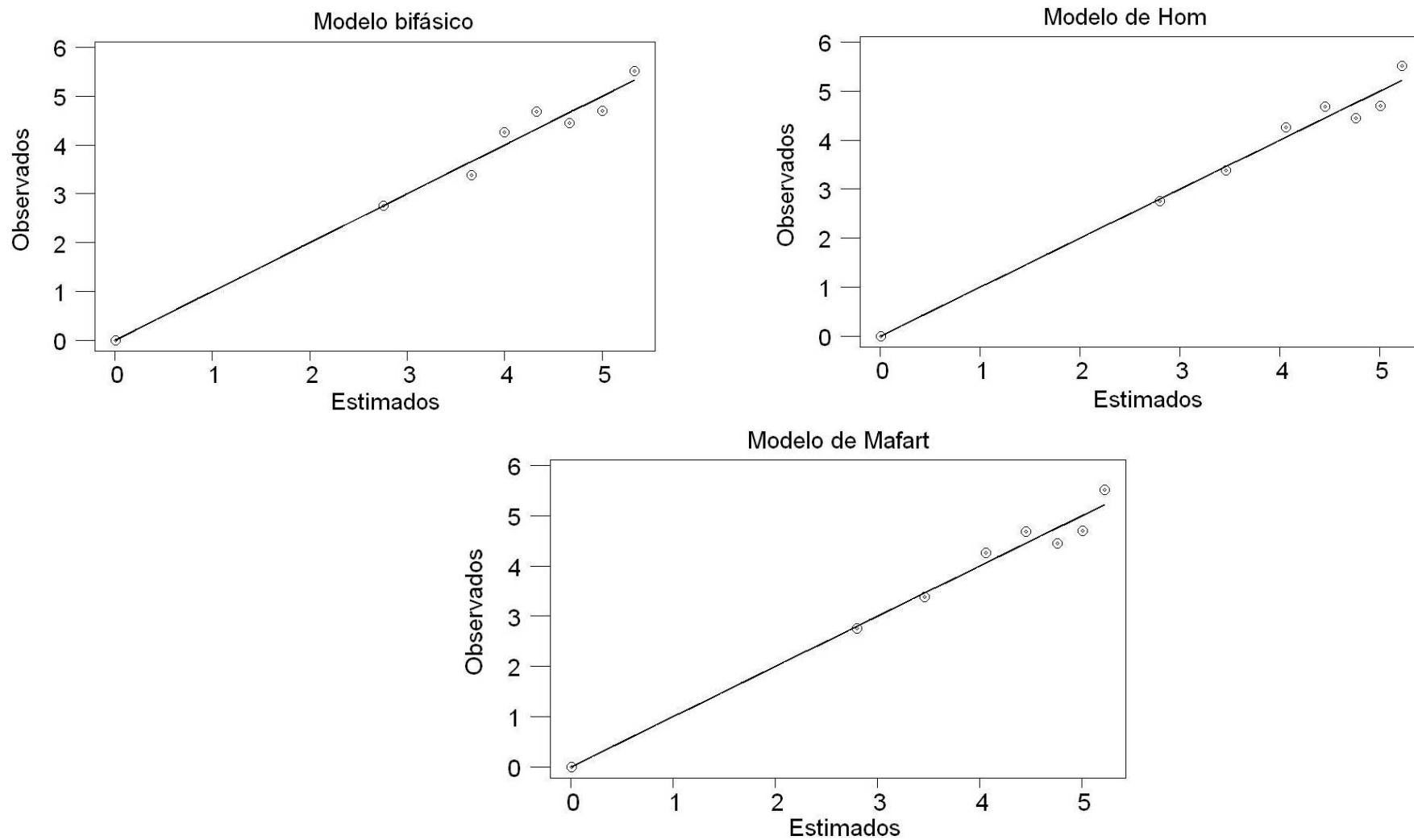


Figura 5.46. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de fotocatalisis.  $\lambda$  290-800 nm.

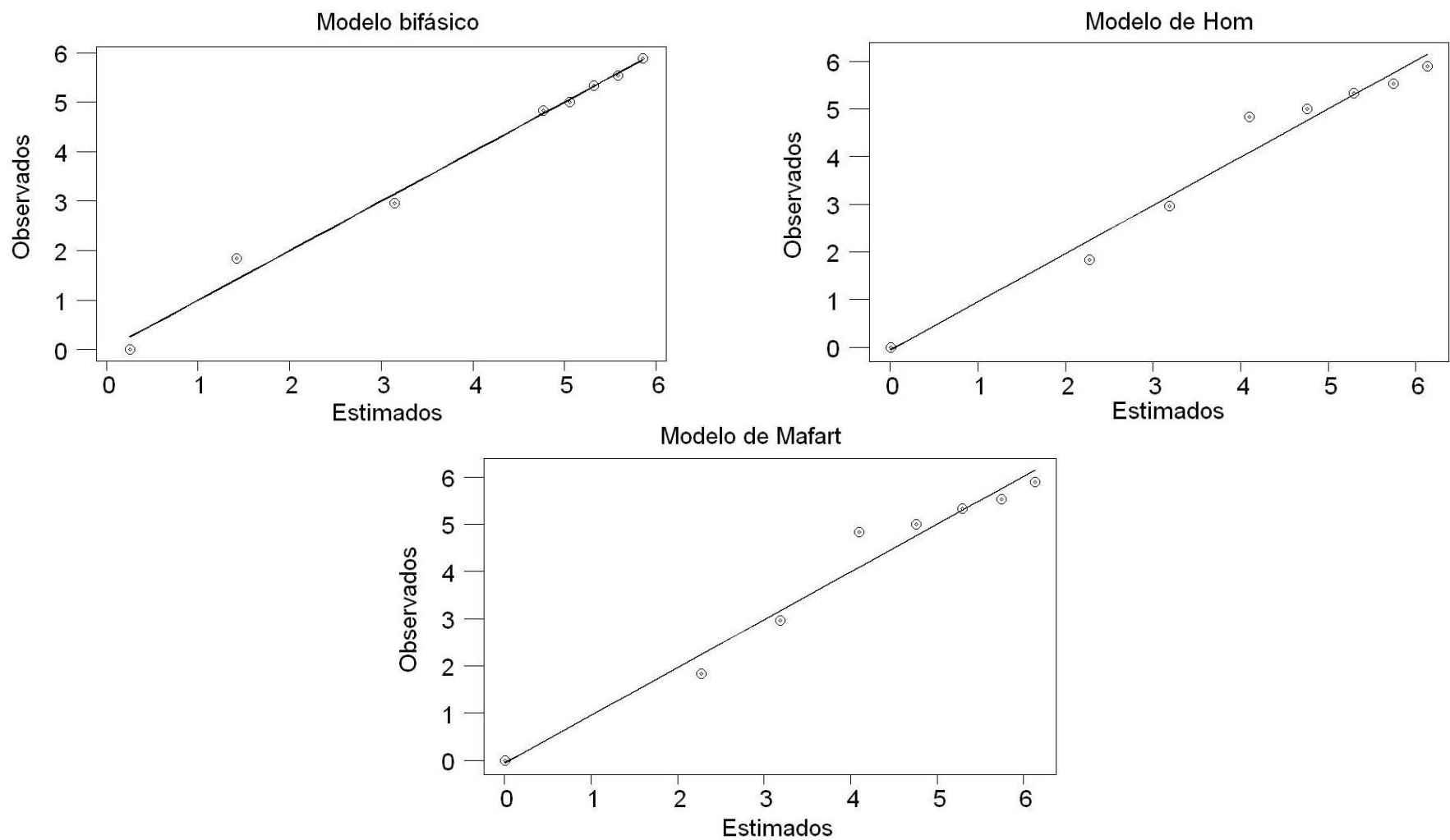


Figura 5.47. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de fotocátalisis/ $\text{H}_2\text{O}_2$ .  $\lambda$  290-800 nm.

### 5.3. Estudio económico

Para estimar los costes de los tratamientos basados en irradiación UV/VIS, se consideran los costes relativos a los agentes empleados y los costes asociados al consumo de electricidad de la cámara solar. También se ha tenido en cuenta el coste asociado a la vida útil de la lámpara solar. Estos agentes son la irradiación, el peróxido de hidrógeno y el dióxido de titanio, cuyos costes se recogen en la Tabla 5.16.

Los cálculos se realizan para un nivel de inactivación de 1 unidad logarítmica (90 % de inactivación), calculándose el tiempo necesario para alcanzar dicho nivel con el modelo cinético que mejor se ajusta en cada caso, bajo el rango del espectro solar 320-800nm. No se tiene en cuenta el rango UVB porque a escala real, es absorbido en gran medida por la capa de ozono de la atmósfera, tal y como se indica en el apartado 2.3.5 de la presente memoria y por tanto, participa en menor medida en el proceso de desinfección a escala real.

Tabla 5.16. Coste de los agentes utilizados en los tratamientos de irradiación.

Agente	Precio	Fuente/Empresa
Cámara solar	Coste lámpara <sup>1</sup> : 0,0025 €/h Coste electricidad <sup>2</sup> : 0,004 €/h	<i>Lucas et al., 2010</i>
TiO <sub>2</sub>	1,55 €/Kg	Degussa Ibérica S.A.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30% )	0,21€/Kg	FCM Foret, Zaragoza

<sup>1</sup>Coste de la sustitución de la lámpara: 20 Euros/lámpara, 8000h de vida media útil.

<sup>2</sup>Coste de electricidad para el funcionamiento de la lámpara UV.

En la Tabla 5.17 se indican los costes de cada uno de los tratamientos para cada uno de los distintos indicadores bacterianos estudiados y a continuación, la expresión utilizada para realizar el cálculo de cada agente utilizado:

- Irradiación: coste lámpara + coste electricidad  
 $0,0025 \text{ €/h} \cdot (\text{minutos tratamiento}/60) + 0,004 \cdot (\text{minutos tratamiento}/60)$

- $\text{H}_2\text{O}_2$ : dosis · riqueza · coste:

$$0,04 \cdot 10^{-6} \text{ kg/L} \cdot \frac{100}{0,3} \cdot 0,21 \text{ €/kg} = 2,8 \cdot 10^{-6} \text{ €/L} = 0,0028 \text{ €/m}^3$$

- $\text{TiO}_2$  (1g/L): dosis · coste

$$1 \cdot 10^{-3} \text{ kg/L} \cdot 1,55 \text{ €/kg} = 1,55 \cdot 10^{-3} \text{ €/L} = 1,55 \text{ €/m}^3$$

Tabla 5.17. Costes del tratamiento de irradiación, fotocátalisis, irradiación/ $\text{H}_2\text{O}_2$  y fotocátalisis/ $\text{H}_2\text{O}_2$  para la inactivación de un 1 unidad logarítmica sobre *C. perfringens* (células y esporos) y *Enterococcus* sp.

Tratamiento	Microorganismo	Tiempo (min)	Coste calculado (€/m <sup>3</sup> )
Irradiación	Células vegetativas	3,56	0,06
	Esporos	82,58	1,38
	<i>Enterococcus</i> sp.	87,78	1,47
Fotocátalisis	Células vegetativas	0,67	1,61
	Esporos	18,47	2,93
	<i>Enterococcus</i> sp.	13,96	3,02
Irradiación/ $\text{H}_2\text{O}_2$	Células vegetativas	0,032	0,07
	Esporos	4,55	1,39
	<i>Enterococcus</i> sp.	47,04	1,47
Fotocátalisis/ $\text{H}_2\text{O}_2$	Células vegetativas	0,28	1,62
	Esporos	6,41	2,94
	<i>Enterococcus</i> sp.	14,83	3,02

Como puede derivarse de la tabla anterior, los procesos a los que se adiciona  $\text{TiO}_2$  son los que presentan un coste más elevado, ya que es un reactivo caro en comparación al resto. Sin embargo, se ha mencionado con anterioridad que el dióxido de titanio puede recuperarse y reutilizarse después del tratamiento (Fernández, 2003).

También se podría reducir el coste de los cuatro tratamientos si en lugar de utilizar una cámara solar artificial, se aprovecha la radiación directa y difusa del espectro solar mediante colectores, entre los que destacan los colectores cilíndricos parabólicos compuestos (CPC) (Fernández, 2003; Blanco et al., 2009).

Por otro lado, destaca el mayor coste de los tratamientos calculados para esporos y *Enterococcus* sp., por presentar una mayor resistencia a los tratamientos de irradiación en relación a las células vegetativas de *C. perfringens*.

Finalmente cabe destacar que el coste de todos los tratamientos basados en irradiación son superiores a los calculados para el hipoclorito sódico (apartado 4.2.2.6).



## Capítulo 6.

Eliminación de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp.  
mediante POAs basados en ozono

---





## 6.1. Procedimiento experimental

### 6.1.1. Muestras

#### 6.1.1.1. Muestras de agua sintética fortificadas con células vegetativas de *C. perfringens*

La muestra sintética se prepara a partir de cloruro sódico (Panreac) disuelto en agua destilada al 0,9%, con un pH similar al agua natural (*Cushnie et al., 2009*). La suspensión bacteriana concentrada se prepara como se describe en el apartado 4.2.1.2 y se vierte sobre la muestra sintética, alcanzando una población bacteriana entorno a  $10^6$ - $10^8$  UFC·100 mL<sup>-1</sup>.

#### 6.1.1.2. Muestras de agua natural fortificadas con células vegetativas de *C. perfringens*

Las muestras de agua natural fortificadas con células vegetativas de *C. perfringens* se preparan conforme se detalla en el apartado 4.2.1.2 de la presente memoria. La concentración inicial de células vegetativas en las muestras asciende a  $10^7$ - $10^8$  UFC·100 mL<sup>-1</sup>.

#### 6.1.1.3. Muestras de agua natural fortificadas con *Enterococcus* sp.

Las muestras de agua natural fortificadas con *Enterococcus* sp. se preparan conforme se detalla en el apartado 4.2.1.2 de la presente memoria. La concentración inicial de bacterias en las muestras es alrededor de  $10^8$  UFC·100 mL<sup>-1</sup>.

### 6.1.2. Agentes utilizados en los tratamientos

#### 6.1.2.1. Ozono

El ozono se genera “in situ” en el laboratorio mediante un ozonizador Fischer modelo 500. El equipo consta de dos electrodos entre los que se establece un alto voltaje y por los que fluye una corriente de oxígeno puro. En la descarga eléctrica que se produce, se genera oxígeno atómico que al combinarse con el molecular produce una molécula de ozono (Figura 6.1).

La descripción completa de la instalación de ozonización se detalla a continuación y se completa con la Figura 6.2.

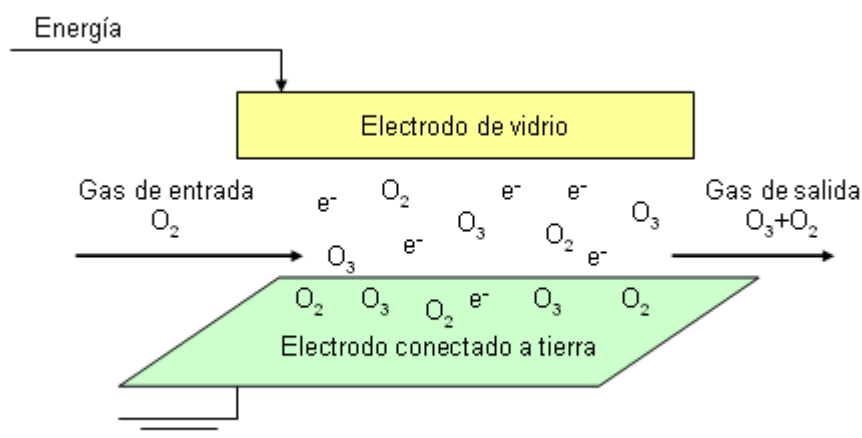


Figura 6.1. Esquema de generación de ozono mediante descarga eléctrica.

El oxígeno se aporta desde una botella de gas comprimido conectada directamente al ozonizador (1). La generación de ozono aumenta con el caudal de oxígeno introducido, por lo que se regula el flujo mediante una válvula situada en el frontal del equipo. Entre la botella de gas y el ozonizador, se coloca un lecho de sílica gel (2) que debido a sus propiedades higroscópicas elimina la humedad de la corriente de  $O_2$  antes de entrar en el ozonizador (3), ya que el gas de entrada siempre debe estar seco. El ozonizador se conecta a un reactor cerrado de vidrio (4) que funciona en régimen semicontinuo, continuo respecto al gas y discontinuo respecto al líquido. Este reactor es de vidrio Pyrex con forma esférica y una capacidad de 3 L. El ozono gas se trasfiere a la muestra por la parte superior del reactor a través de un difusor poroso ( $O_3$  introducido). La transferencia del ozono al agua produce un burbujeo que proporciona agitación a la muestra, favoreciendo el contacto ozono-agua. El ozono introducido se mantiene constante a lo largo de cada experimento.

Como todo el ozono producido no llega a consumirse en la reacción, el exceso debe destruirse ( $O_3$  no consumido). Para ello se conectan en serie al reactor dos o tres borboteadores (5) que contienen una disolución de yoduro potásico al 2%. El ozono reacciona con el yoduro reduciéndose a oxígeno y liberándose a la atmósfera. El experimento debe llevarse a cabo en una campana de extracción ya que el ozono es un elemento tóxico.

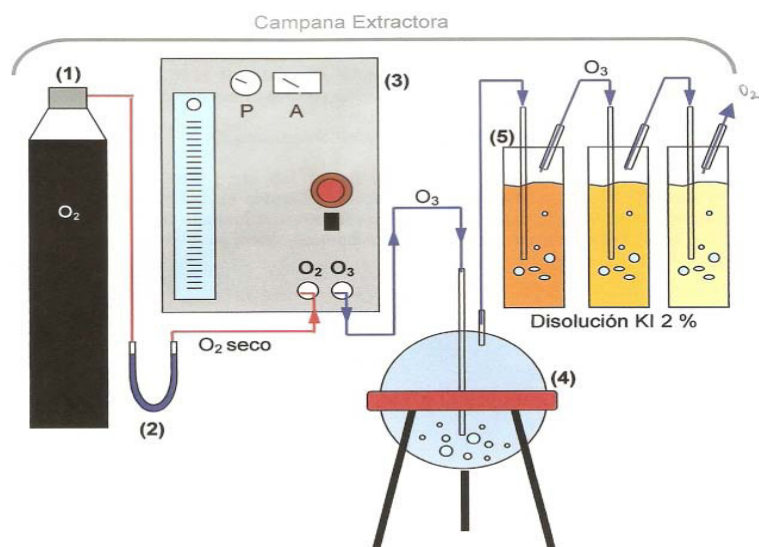


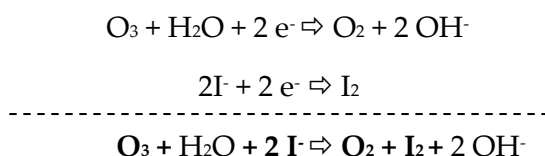
Figura 6.2. Descripción de la instalación de ozonización.

El  $O_3$  consumido por la muestra se define por la ecuación 6.1. El ozono residual disuelto en el agua se mide siguiendo la metodología analítica mostrada en el apartado 3.2.2 de la presente memoria.

$$O_3 \text{ consumido} = O_3 \text{ introducido} - (O_3 \text{ no consumido} + O_3 \text{ residual disuelto}) \quad [6.1]$$

Para determinar la cantidad de ozono que se produce por unidad de oxígeno introducido, se realizan una serie de ensayos con caudales variables de oxígeno y con diferentes intervalos de tiempo, determinándose en cada caso la cantidad de ozono que se genera. Para ello se conectan tres borboteadores en serie directamente a la salida del ozonizador conteniendo cada uno 250 mL de KI al 2%. Durante un tiempo fijado, se hace pasar por el ozonizador un caudal de oxígeno de 50 y 100 L h<sup>-1</sup>. La potencia de ozonización utilizada es 1,5 W y la presión de oxígeno aplicada es 0,5 bares.

La cantidad de ozono producida se calcula por el método iodométrico (*Kolthoff y Belcher, 1957*). Este método consiste en tomar muestras de la disolución de KI de los borboteadores para cada uno de los caudales de oxígeno y de los intervalos de tiempo utilizados y proceder a su valoración con tiosulfato sódico. Cuando el ozono reacciona con el yoduro, el ozono se reduce a oxígeno y el yoduro se oxida a yodo ( $I_2$ ); la cantidad de ozono producida corresponde estequiométricamente con la cantidad de yodo generada en la disolución de KI:



El procedimiento analítico consiste en la valoración del yodo formado con una disolución de tiosulfato sódico. Se añade 1ml de HCl 1N, ya que se requiere medio ácido para la valoración. Se comienza a valorar hasta que el color pardo rojizo que aparece como consecuencia del  $\text{I}_2$  formado se torna amarillo pálido. En este momento se añade el indicador de almidón, puesto que si se añadiera a la muestra inicial, en la que la cantidad de yodo es muy superior, se formaría un complejo que impediría valorar el yodo correctamente. Al añadir el almidón, aparece un color morado que virará a incoloro tras haberse alcanzado el punto de equivalencia.

La cantidad de ozono generado, en  $\text{mg h}^{-1}$ , se calcula según la ecuación 6.2 donde  $V$  es el volumen del agente valorante (tiosulfato sódico) consumido,  $N$  es la normalidad del tiosulfato,  $V'$  es el volumen de yoduro potásico utilizado en la valoración,  $t$  es el tiempo (en minutos) de funcionamiento del ozonizador y 24, el peso equivalente del ozono.

$$mgO_3h^{-1} = V \cdot N \cdot \left( \frac{250}{V'} \right) \cdot 24 \cdot \left( \frac{60}{t} \right) \quad [6.2]$$

Como se trabaja con tres borboteadores en serie, los  $\text{mg O}_3 \text{ h}^{-1}$  totales son la suma de los  $\text{mg O}_3 \text{ h}^{-1}$  retenidos por cada borboteador.

El agente valorante, tiosulfato sódico, al no ser patrón primario, se debe estandarizar con dicromato potásico para determinar exactamente su concentración (Eaton et al., 2005). Para ello, se toman 80 ml de agua destilada a la que se añaden 1 mL de HCl 1N, 1 g de KI y 10 mL de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  0,1N. Esta mezcla debe permanecer 6 minutos en oscuridad antes de ser valorada con la disolución de tiosulfato que se va a estandarizar. Igualmente, se valora hasta que el color pardo rojizo pasa a amarillo y tras la adición del almidón, se valora hasta la desaparición del color morado. La normalidad real del tiosulfato sódico se calcula según la ecuación 6.3.

$$N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = \frac{1}{mL \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \quad [6.3]$$

### 6.1.2.2. Dióxido de titanio

El tipo de  $\text{TiO}_2$  utilizado en los tratamientos de ozonización es el mismo que se utiliza en los tratamientos fotocatalíticos, descrito con detalle en el apartado 5.1.2.2 de la presente memoria.

### 6.1.2.3. Peróxido de hidrógeno

Al igual que en los tratamientos fotocatalíticos, y tal y como se describe en la sección 5.1.2.3 de la presente memoria, el peróxido utilizado proviene de una concentración al 30% (v/v) (Carlo Erba).

## **6.2. Condiciones de operación, resultados e interpretación**

### **6.2.1. Condiciones de operación**

El caudal de oxígeno seleccionado para los ensayos es  $100 \text{ L h}^{-1}$  y la dosis de ozono generada con este caudal de oxígeno es de  $578 \text{ mg O}_3 \text{ h}^{-1}$ .

El volumen de la muestra a tratar es 1,5 L y los ensayos se realizan a temperatura ambiente ( $23^\circ\text{C}$ ).

En los tratamientos de ozono combinado con peróxido de hidrógeno (peroxona) y de ozono combinado con dióxido de titanio, las dosis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{TiO}_2$  aplicadas son de 0,04 mM ( $1,365 \text{ mg H}_2\text{O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ) y  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente. En ozonización, algunos autores han trabajado con dosis bajas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,02-0,04 mM) con buenos resultados en la desinfección (*Sommer et al, 2004; Cho y Yoon, 2006*); otros recomiendan establecer una relación molar  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$  de 0,5 para mejorar la eliminación de compuestos presentes en el agua<sup>4</sup> (*Glaze et al., 1987; Bellamy et al., 1991; Miguel, 2010*).

Ambas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{TiO}_2$  coinciden con las utilizadas para los tratamientos fotocatalíticos, descritos en el capítulo 5 de la presente memoria. Cada reactivo se adiciona directamente al reactor de vidrio instantes antes de comenzar la dosificación de ozono. Para evitar que el  $\text{TiO}_2$  se deposite en el fondo del reactor a lo largo del experimento, se introduce un imán magnético en el reactor.

Durante la realización de los experimentos, se toman muestras a diferentes intervalos de tiempo con el fin de evaluar la efectividad de los tres tratamientos sobre las poblaciones bacterianas estudiadas, hasta un máximo de 10 minutos, final del

tratamiento. Tanto el ozono como el peróxido de hidrógeno residual en las muestras tomadas se neutralizan con tiosulfato sódico 1N para evitar que estas dosis residuales sigan ejerciendo su efecto bactericida sobre las poblaciones supervivientes.

## 6.2.2. Inactivación de células vegetativas de *C. perfringens*

### 6.2.2.1. Resultados del tratamiento de ozonización

En la Tabla 6.1 se muestran los resultados obtenidos tras el análisis de diversos parámetros físico-químicos en las muestras natural y sintética, tras someterlas al tratamiento de ozonización.

Tabla 6.1. Resultados físico-químicos en el tratamiento de ozonización sobre la muestra natural (MN) y sintética (MS) de *C. perfringens* (células vegetativas).

Tiempo (min)	pH		Conductividad	
	MN	MS	MN ( $\mu\text{s cm}^{-1}$ )	MS( $\text{ms cm}^{-1}$ )
0	7,32	6,72	574	14,80
0,17	---	7,56	---	14,92
0,5	7,33	8,61	589	14,99
1	7,58	7,78	553	14,89
5	7,60	6,87	577	14,73
10	7,88	6,77	798	14,85

No se observan, en cualquiera de las muestras, variaciones significativas en el pH y la conductividad a lo largo del tratamiento. El pH del agua natural tiende a ser ligeramente más alcalino con respecto a la muestra sintética ya que ésta presenta iones alcalinos como carbonatos y bicarbonatos aportando alcalinidad al agua. En la misma línea, la conductividad es muy superior en el caso de esta última por albergar iones cloruro e iones de sodio debido a la composición salina de su matriz.

En la Tabla 6.2 se reflejan las condiciones de trabajo establecidas durante los experimentos de ozonización aplicados. En la Figura 6.3 se representan las curvas de

inactivación de *C. perfringens* a lo largo del tratamiento sobre ambos tipos de muestras, la natural y la sintética.

Tabla 6.2 Recuentos de células vegetativas de *C. perfringens* y condiciones del tratamiento de ozonización sobre la muestra natural (MN) y sintética (MS).

MN	Tiempo (min)	0	0,5	1	5	10	
	N <sub>t</sub> (UFC·100 mL <sup>-1</sup> )	2,7·10 <sup>6</sup>	1,9·10 <sup>6</sup>	1,5·10 <sup>2</sup>	2·10 <sup>1</sup>	6	
	V muestra tomado (mL)	300	250	250	250	250	
	V actuación (L)	1,5	1,5	1,250	1	0,750	
	mg O <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> consumido	0	1,57	3,76	23,5	62,5	
MS	Tiempo (min)	0	0,17	0,5	1	5	10
	N <sub>t</sub> (UFC·100 mL <sup>-1</sup> )	3,9·10 <sup>7</sup>	4,6· 10 <sup>6</sup>	6,8·10 <sup>2</sup>	1·10 <sup>2</sup>	0	0
	V muestra tomado (mL)	60	60	60	200	200	200
	V actuación (L)	1,5	1,44	1,38	1,32	1,12	0,920
	mg O <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> consumido	0	0,38	1,19	2,50	14,73	36,15

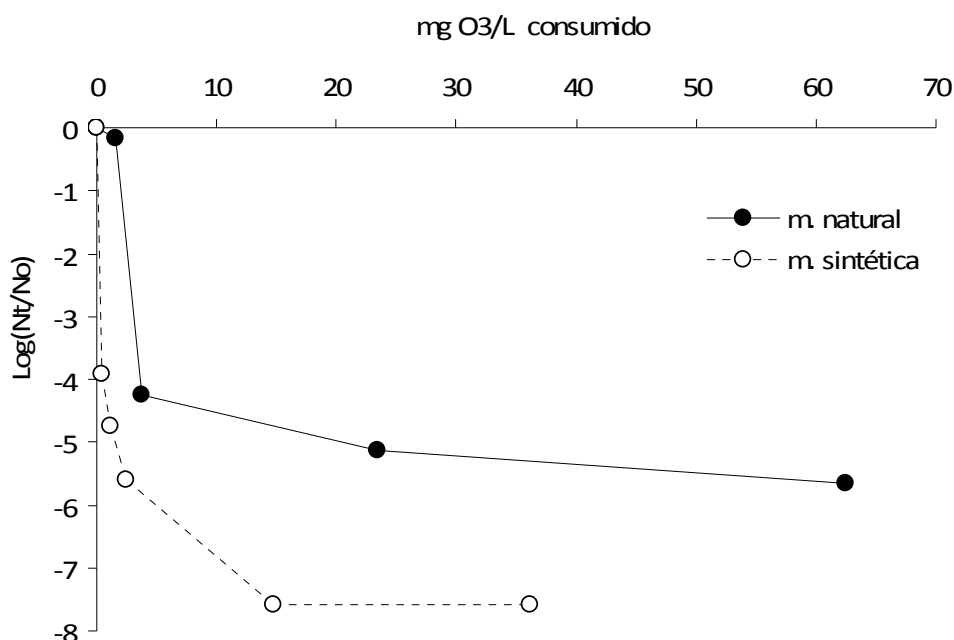


Figura 6.3. Inactivación de las células vegetativas de *C. perfringens* en el tratamiento de ozonización sobre la muestra natural y sintética.  $N_0=2,7 \cdot 10^6$  y  $N_0=3,9 \cdot 10^7$  UFC·100mL<sup>-1</sup>, respectivamente.



En la muestra natural, la población bacteriana disminuye más lentamente ante la agresión y es necesario un consumo mayor de ozono para conseguir el mismo nivel de inactivación que el obtenido por la muestra sintética. En ésta última, la pendiente de inactivación es más mucho más pronunciada y se consiguen recuentos mayores con dosis inferiores de ozono. Para alcanzar 4 unidades logarítmicas de inactivación (o una reducción del 99,99 %) son necesarias dosis de ozono de 3,6 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> en la muestra natural y 0,42 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> en la sintética. Se ha seleccionado ese nivel de inactivación debido a que, tal y como se documenta en la Tabla 2.10 de la presente memoria, la carga microbiológica de las aguas del Canal Imperial de Aragón, antes de su tratamiento de potabilización, puede alcanzar niveles de hasta 10<sup>4</sup> UFC·100 mL<sup>-1</sup>. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos recomienda una reducción de 4 logaritmos para virus y de 3 logaritmos para el control de *Giardia* (USEPA, 2004).

El ozono, en la muestra natural, además de reaccionar con las bacterias, oxida los sólidos en suspensión y los compuestos orgánicos e inorgánicos que el agua normalmente contiene mientras que en la muestra sintética, las células vegetativas no compiten con ningún otro elemento, derivando en un ritmo de inactivación más rápido pues la relación desinfectante-microorganismo es exclusiva. Por tanto, las reacciones entre el ozono y la materia orgánica interfieren con alguna de las reacciones responsables en la inactivación de *C. perfringens*, afectando a la eficacia de la ozonización.

Conclusiones similares han sido obtenidas por diversos autores sobre otros microorganismos. Ireland (1993) establece que la presencia de materia orgánica en el medio reduce las cinéticas de inactivación de *E. coli* al competir con las bacterias sobre las especies oxidantes generadas durante el tratamiento de desinfección. Hunt y Mariñas (1999) también indican que el ozono disuelto se descompone más rápidamente en presencia de ácidos húmicos y por tanto, las células bacterianas de *E. coli* están menos expuestas al desinfectante, siendo su inactivación más lenta. Otro factor que puede afectar a la eficiencia del tratamiento es la formación de agregados de microorganismos entre sí y con material particulado, fortaleciéndose frente al ataque del desinfectante.

En consecuencia, mayores dosis de ozono son necesarias en presencia de materia orgánica para obtener los mismos resultados de inactivación bacteriana, tal y como se deriva de la Tabla 6.2. Para ambas muestras, el tratamiento de ozonización consigue recuentos bacterianos finales bajos, considerando una desinfección total de la muestra tras los 10 minutos de tratamiento.

Si se establece como referencia una dosis de 3 mg L<sup>-1</sup> de ozono, dosis habitualmente utilizada en ETAPs en España (Mosteo *et al.*, 2009), la eliminación logarítmica alcanzada de *C. perfringens* en el tratamiento de ozonización en la muestra natural es de 2,8 unidades logarítmicas.

#### 6.2.2.2. Resultados del tratamiento de peroxona (O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

La Tabla 6.3 muestra los resultados derivados del análisis de los parámetros físico-químicos en muestras naturales y sintéticas tras la aplicación del tratamiento peroxona.

No se observan, en cualquiera de las muestras, variaciones significativas en el pH y la conductividad a lo largo del tratamiento. Sin embargo, los valores de pH son superiores a los observados en el tratamiento de ozonización (Tabla 6.1), hecho que implica que la peroxona forme parte de los procesos de oxidación avanzada, tal y como bien se describe en el apartado 2.4.3 de la presente memoria.

Tabla 6.3. Resultados físico-químicos en el tratamiento de peroxona sobre la muestra natural (MN) y sintética (MS) de *C. perfringens* (células vegetativas).

Tiempo (min)	pH		Conductividad	
	MN	MS	MN (μs cm <sup>-1</sup> )	MS(ms cm <sup>-1</sup> )
0	7,71	7,96	610	14,95
0,17	---	7,84	---	14,98
0,5	7,73	7,73	605	15,01
1	7,75	7,69	584	14,91
5	7,97	7,31	611	14,96
10	8,11	7,10	611	14,91

La Tabla 6.4 refleja las condiciones de trabajo establecidas durante los experimentos de peroxona aplicados. En la Figura 6.4 se muestran las curvas de inactivación de *C. perfringens* a lo largo del tratamiento sobre ambos tipos de muestras, la natural y la sintética.

De los resultados mostrados en la tabla se puede derivar que al igual que ocurría en el tratamiento de ozonización, el ozono consumido por la muestra natural es muy superior al consumido por la muestra sintética para obtener los mismos niveles de inactivación, debido a la reacción del ozono con la materia orgánica e inorgánica natural presente en el agua. Como ejemplo, estableciendo un orden de inactivación bacteriana de 4 unidades logarítmicas, es necesaria una dosis de ozono de 2,7 mg L<sup>-1</sup> en la muestra natural y 0,06 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> en la sintética para alcanzarlo.

Si se comparan los resultados del tratamiento de ozonización (Tabla 6.2) con los obtenidos en el tratamiento peroxona (Tabla 6.4), se observa que la adición del peróxido de hidrógeno al ozono supone una inactivación más rápida de las poblaciones bacterianas con un menor consumo de ozono por parte de las muestras.

Tabla 6.4. Recuentos de células vegetativas de *C. perfringens* y condiciones del tratamiento de peroxona sobre la muestra natural (MN) y sintética (MS). [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=0,04 mM.

MN	Tiempo (min)	0	0,5	1	5	10	
	N <sub>t</sub> (UFC 100mL <sup>-1</sup> )	9,8·10 <sup>5</sup>	---	5	0	0	
	V muestra tomado (mL)	100	100	250	250	250	
	V actuación (L)	1,5	1,4	1,3	1,05	0,8	
	mg O <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> consumido	0	1,64	3,53	21,9	57,9	
MS	Tiempo (min)	0	0,17	0,5	1	5	10
	N <sub>t</sub> (UFC 100mL <sup>-1</sup> )	9·10 <sup>7</sup>	4,8· 10 <sup>3</sup>	4,8·10 <sup>2</sup>	2,8·10 <sup>2</sup>	5	0
	V muestra tomado (mL)	20	200	300	200	250	200
	V actuación (L)	1,5	1,5	1,3	1	0,8	0,55
	mg O <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> consumido	0	0,066	0,23	0,60	3,75	10,9

En la Figura 6.4 se observa que la pendiente de inactivación bacteriana en la muestra sintética es más rápida en comparación con la muestra natural, al igual que se ha observado anteriormente en el tratamiento de ozonización (Figura 6.3).

A nivel molecular, diversos autores defienden que el peróxido de hidrógeno activa el mecanismo indirecto de actuación del ozono, favoreciéndose la generación de radicales altamente reactivos, en mayor medida radicales hidroxilo (Glaze *et al.*, 1987; Staehelin y Hoigné, 1982). Este hecho favorecería la efectividad del tratamiento peroxona sobre el de ozonización, como se ha observado sobre las células vegetativas de *C. perfringens*, cuya inactivación es superior con el sistema combinado ozono-peróxido.

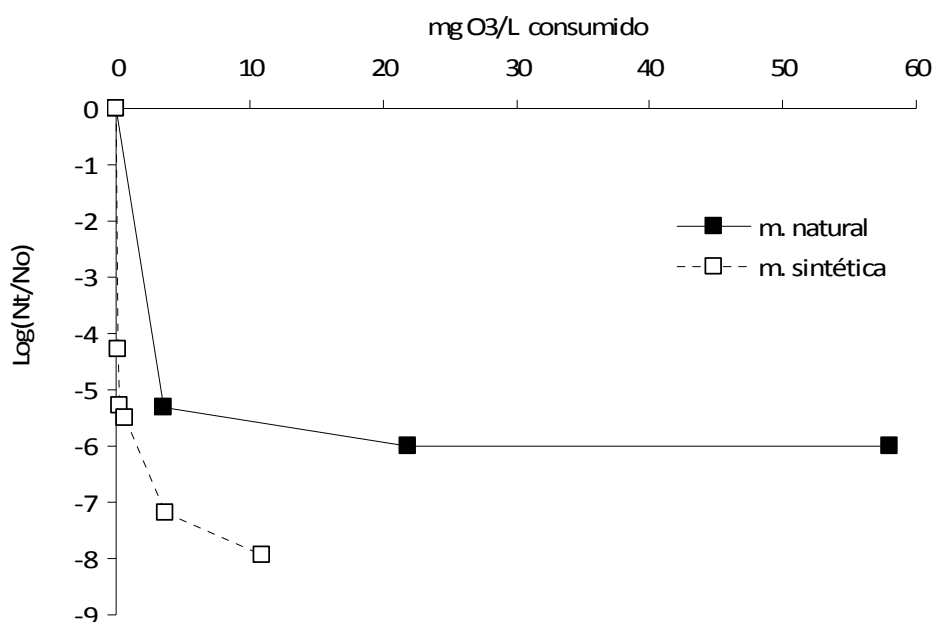


Figura 6.4. Inactivación de las células vegetativas de *C. perfringens* en el tratamiento de peroxona sobre la muestra natural y sintética.  $N_0 = 9,8 \cdot 10^5$  y  $N_0 = 9 \cdot 10^7$  UFC  $\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ , respectivamente.  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0,04 \text{ mM}$ .

Resultados similares son publicados por Cho y Yoon (2006) después de un estudio sobre el incremento del efecto bactericida de la peroxona seguido por la cloración sobre esporos de *Bacillus subtilis*, sugiriendo este sistema como alternativa viable cuando el ozono por sí solo no satisface el requerimiento de desinfección establecido. Estos autores defienden que los radicales hidroxilo por sí mismos son mucho más efectivos en la inactivación de microorganismos que el ozono molecular.

Con una dosis de referencia de 3 mg L<sup>-1</sup> de ozono, la eliminación de *C. perfringens* obtenida en el tratamiento peroxona es de 4,5 unidades logarítmicas en la muestra de agua natural, una inactivación 1,6 veces superior a la obtenida con ozono en solitario.

Wolfe (1989) realizó un estudio en el que indicaba que el rendimiento del tratamiento de peroxona depende en gran medida de la relación H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub>. Sus resultados sugerían que la relación en peso óptima para la desinfección debe ser menor o igual a 0,3. En este estudio, la relación elegida ha sido 0,5, como en otros estudios consultados (Glaze *et al.*, 1987; Bellamy *et al.*, 1991; Miguel, 2010). Los resultados de Wolfe corroboran que la dosis de ozono para conseguir un elevado nivel de inactivación de las poblaciones de *E. coli* depende de la calidad del agua a tratar, factor que ejerce una influencia elevada en el proceso de desinfección.

#### 6.2.2.3. Resultados del tratamiento de ozono combinado con TiO<sub>2</sub>

La Tabla 6.5 muestra los resultados derivados del análisis de los parámetros físico-químicos en muestras naturales y sintéticas tras la aplicación del tratamiento de ozono combinado con TiO<sub>2</sub>. No se observan, en cualquiera de las muestras, variaciones significativas en el pH y la conductividad a lo largo del tratamiento. Los valores de pH en la muestra sintética son bastante bajos por lo que no presentan carácter de oxidación avanzada.

Tabla 6.5. Resultados físico-químicos en el tratamiento de ozono combinado con TiO<sub>2</sub> sobre la muestra natural (MN) y sintética (MS) de *C. perfringens* (células vegetativas).

Tiempo (min)	pH		Conductividad	
	MN	MS	MN (μs cm <sup>-1</sup> )	MS(ms cm <sup>-1</sup> )
0	7,66	6,42	595	14,76
0,17	---	6,40	---	14,81
0,5	7,77	6,41	597	14,86
1	7,81	6,38	607	14,95
5	7,87	6,32	595	14,80
10	7,87	6,23	611	14,85

La Tabla 6.6 refleja las condiciones de trabajo establecidas durante los experimentos de  $O_3/TiO_2$  aplicados y en la Figura 6.5 se muestran las curvas de inactivación de *C. perfringens* sobre ambos tipos de muestras.

Tabla 6.6. Recuentos de células vegetativas de *C. perfringens* y condiciones del tratamiento de ozono combinado con  $TiO_2$  sobre la muestra natural (MN) y sintética (MS).  $[TiO_2]=1 \text{ g L}^{-1}$ .

MN	Tiempo (min)	0	0,5	1	5	10	
	N <sub>t</sub> (UFC 100mL <sup>-1</sup> )	1·10 <sup>6</sup>	2,1·10 <sup>5</sup>	3·10 <sup>2</sup>	2	0	
	V muestra tomado (mL)	100	100	250	250	250	
	V actuación (L)	1,5	1,4	1,3	1,05	0,8	
	mg O <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> consumido	0	1,6	3,46	21,42	56,7	
MS	Tiempo (min)	0	0,17	0,5	1	5	10
	N <sub>0</sub> (UFC 100mL <sup>-1</sup> )	5,7·10 <sup>7</sup>	2,5·10 <sup>6</sup>	6,3·10 <sup>2</sup>	7,1·10 <sup>1</sup>	2	0
	V muestra tomado (mL)	60	60	60	200	200	150
	V actuación (L)	1,5	1,44	1,38	1,32	1,12	0,92
	mg O <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> consumido	0	0,44	1,37	2,88	16,96	41,36

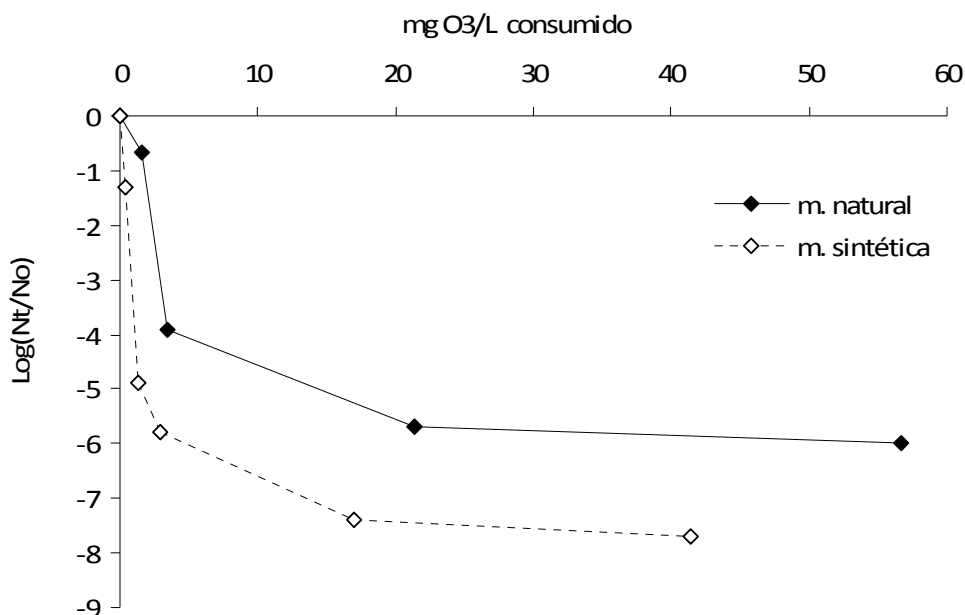


Figura 6.5. Inactivación de las células vegetativas de *C. perfringens* en el tratamiento de ozono combinado con  $TiO_2$  sobre la muestra natural y sintética.  $N_0=10^6$  y  $N_0=5,7 \cdot 10^7$  UFC·100mL<sup>-1</sup>, respectivamente.  $[TiO_2]=1 \text{ g L}^{-1}$ .

El efecto bactericida de la combinación de ozono y dióxido de titanio se pone de manifiesto más rápidamente en la muestra sintética que en la natural, con un menor nivel de supervivencia de las células vegetativas a las mismas dosis de ozono. Se repite el mismo comportamiento observado en los tratamientos de ozono y peroxona anteriormente descritos.

Para conseguir una inactivación de 4 órdenes de magnitud son necesarios 4,25 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> en la muestra de agua natural y 1,15 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> en la sintética. Por tanto, se vuelve a poner de manifiesto que la materia orgánica natural influye sobre la oxidación de las bacterias.

Al final del experimento, se consigue la desinfección completa de ambas muestras, aunque a los 5 minutos, los recuentos ya son prácticamente nulos.

La eliminación bacteriana conseguida con 3 mg L<sup>-1</sup> de ozono en el tratamiento de ozonización catalítica es de 3,1 unidades logarítmicas en la muestra de agua natural. Este resultado es ligeramente superior al obtenido en el tratamiento de ozonización, pero es inferior al alcanzado con el sistema peroxona.

Existen varios estudios que explican los mecanismos que intervienen en este proceso de combinación de ozono con un catalizador. Gracia (1999) establece la participación de varios mecanismos al mismo tiempo. En primer lugar, la ozonización de los componentes disueltos en el medio debido al mecanismo directo del ozono molecular y al mecanismo indirecto de las especies radicalarias provenientes de la descomposición del ozono y en segundo lugar, la ozonización de las partículas adsorbidas en la superficie del dióxido de titanio. Gogniat (2006) también sugiere que tanto los radicales como la adsorción de las células vegetativas sobre las partículas de TiO<sub>2</sub> activadas tienen parte en la desinfección. Señala que la efectividad de la ozonización catalítica depende de muchos factores como la superficie del catalizador, el pH de la solución, etc.

Los resultados obtenidos con este tratamiento muestran una ligera mejora en los niveles de inactivación con respecto al tratamiento de ozonización, si bien cabe destacar que la actividad desinfectante de la peroxona es muy superior a los otros procesos por la mayor producción de radicales OH formados durante el mismo. Este

tratamiento  $O_3/TiO_2$  resultaría más efectivo si el catalizador fuera activado por una fuente de luz con una longitud de onda inferior a 400 nm.

#### 6.2.2.4. Estudio de influencia de variables

Para estudiar la influencia de las diversas variables que participan en los tratamientos de desinfección aplicados sobre las poblaciones vegetativas de *C. perfringens*, se sigue la metodología descrita en el apartado 3.4.1. El factor respuesta seleccionado es la inactivación logarítmica de las poblaciones bacterianas.

Se utiliza un nivel de confianza del 95% para el análisis de resultados, centrado en el estudio de las variables dosis de ozono, tipo de muestra y  $TiO_2$ . Los niveles escogidos para cada una de las variables se muestran en la Tabla 6.7.

Tabla 6.7. Niveles de las variables en los tratamientos de ozono sobre *Clostridium perfringens*.

Variable	Nivel
Dosis de ozono	3 mg L <sup>-1</sup> / 10 mg L <sup>-1</sup>
Tipo de muestra	natural/ sintética
$TiO_2$	ausencia/presencia

En la Figura 6.6 se representan los efectos de cada una de las variables seleccionadas sobre el factor respuesta. La dosis de ozono y el tipo de muestra presentan una influencia positiva sobre la inactivación bacteriana, ya que la pendiente de la recta es positiva. Sin embargo, el uso de catalizador no muestra influencia sobre la inactivación, ya que no produce casi modificación de la respuesta para los dos niveles estudiados.

Tras determinar el efecto de cada una de las variables seleccionadas sobre el factor respuesta, se estudia su interacción en la Figura 6.7. Prácticamente se puede decir que no existe interacción entre las variables, pues las líneas son prácticamente paralelas.



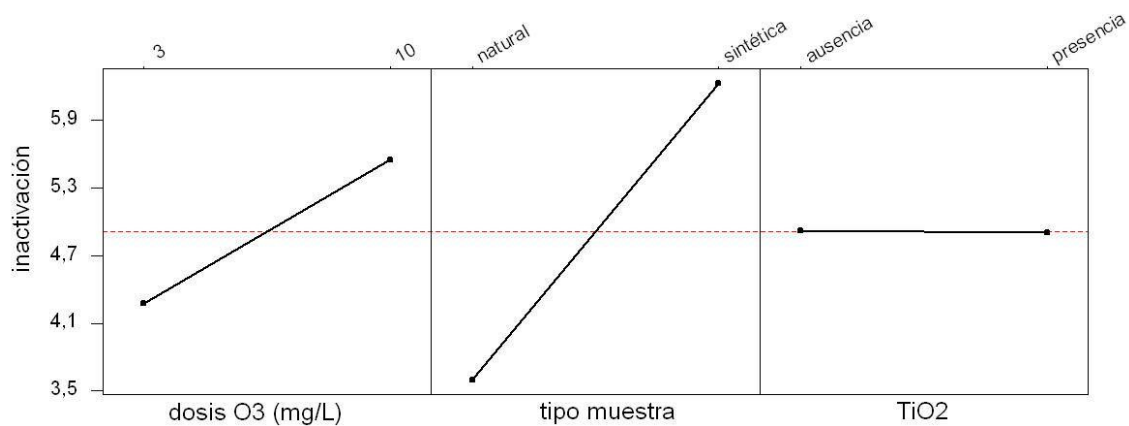


Figura 6.6. Influencia de las variables seleccionadas en los procesos de ozono sobre *C. perfringens*.

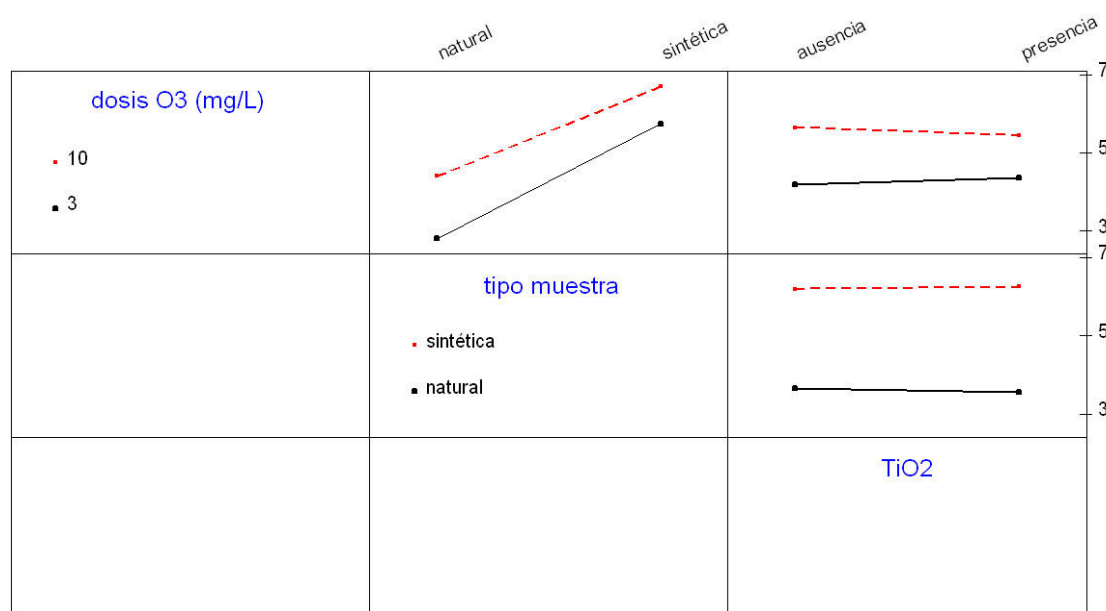


Figura 6.7. Representación gráfica de las interacciones entre las variables utilizadas en los tratamientos de ozonización sobre *C. perfringens*.

Finalmente, con el fin de conocer qué variables e interacciones son significativas en la inactivación de *C. perfringens*, se representa en la Figura 6.8 el diagrama de Pareto. Éste muestra que las variables que influyen sobre la respuesta de inactivación de una manera significativa son el tipo de muestra utilizada y la dosis de ozono aplicada.

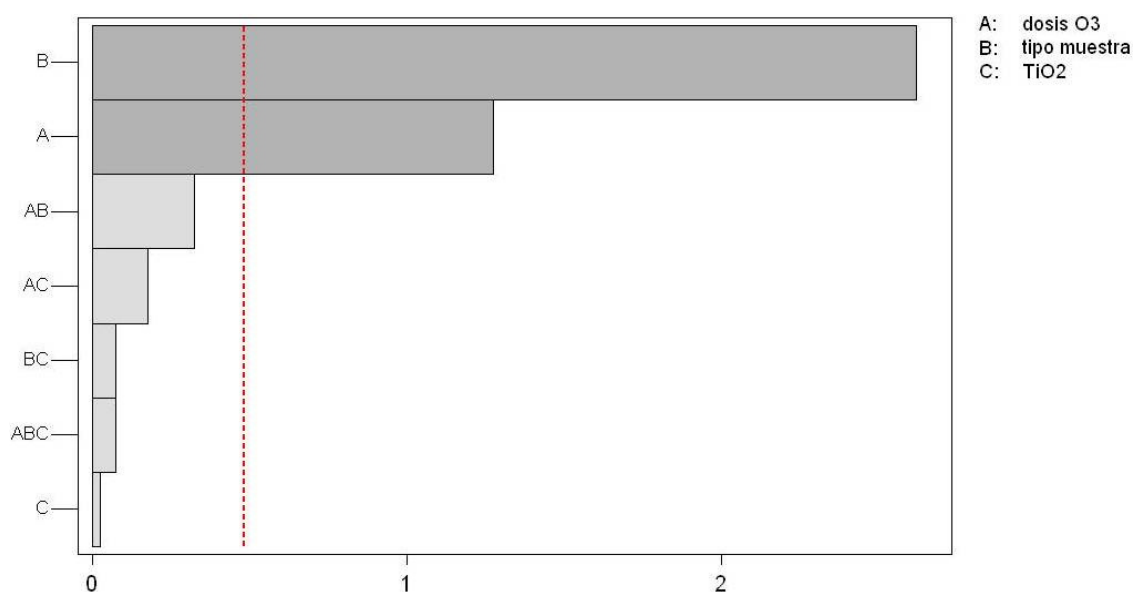


Figura 6.8. Diagrama de Pareto en el que se muestran los efectos significativos sobre el factor respuesta de inactivación.

Tras determinar la influencia del catalizador sobre el factor respuesta, se aborda el estudio de las variables dosis de ozono, tipo de muestra y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los niveles escogidos para cada una de las variables se muestran en la Tabla 6.8.

Tabla 6.8. Niveles de las variables en los tratamientos de ozono sobre *Clostridium perfringens* ( $\text{H}_2\text{O}_2$  en lugar de  $\text{TiO}_2$ ).

Variable	Nivel
Dosis de ozono	3 mg L <sup>-1</sup> / 10 mg L <sup>-1</sup>
Tipo de muestra	natural/ sintética
$\text{H}_2\text{O}_2$	ausencia/presencia

En la Figura 6.9 se representan los efectos de cada una de las variables sobre el factor respuesta. Las tres variables presentan una influencia positiva sobre la inactivación bacteriana, ya que las pendientes de las rectas son positivas, si bien la que presenta una mayor inclinación corresponde a la variable tipo de muestra.

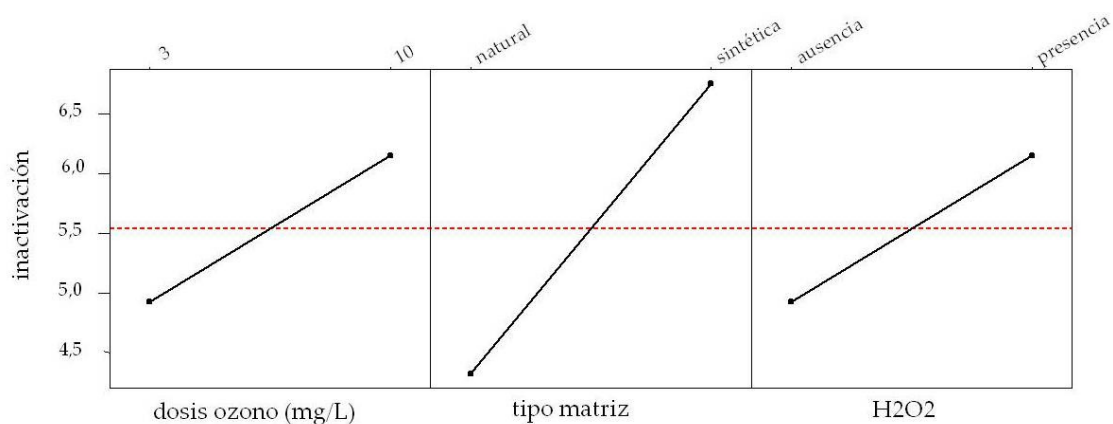


Figura 6.9. Influencia de las variables seleccionadas en los procesos de ozono sobre *C. perfringens* (estudio complementario).

Tras determinar el efecto de cada una de las variables seleccionadas sobre el factor respuesta, se estudia su interacción en la Figura 6.10. Prácticamente se puede concluir que no existe interacción entre las variables, pues las líneas son prácticamente paralelas.

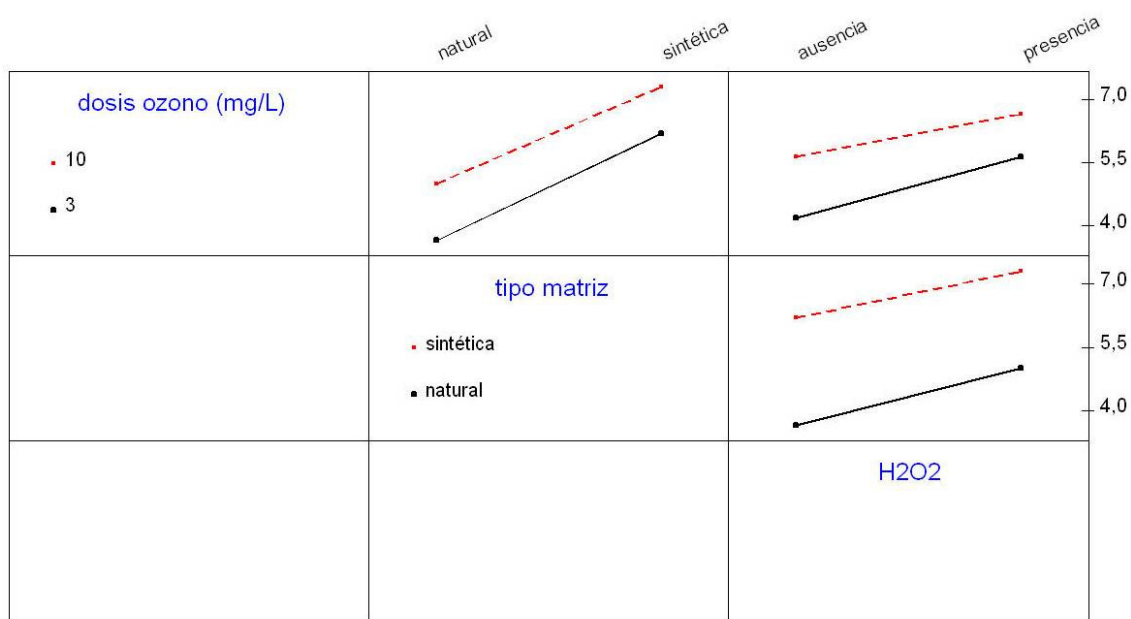


Figura 6.10. Representación gráfica de las interacciones entre las variables utilizadas en los tratamientos de ozonización sobre *C. perfringens* (estudio complementario).

Finalmente, con el fin de conocer qué variables e interacciones son significativas en la inactivación de *C. perfringens*, se representa en la Figura 6.11 el diagrama de Pareto.

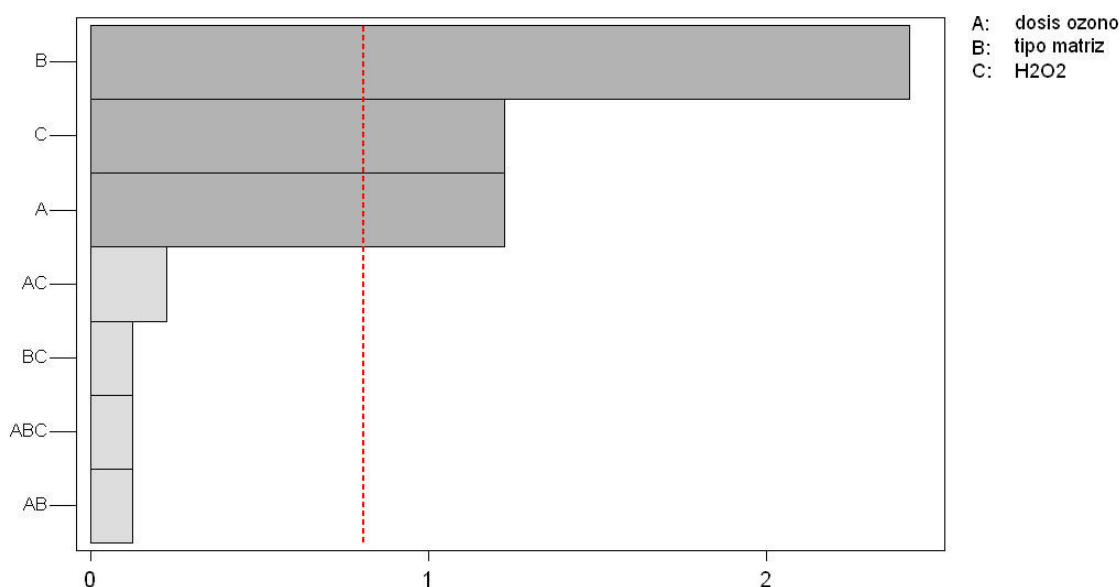


Figura 6.11. Diagrama de Pareto en el que se muestran los efectos significativos sobre el factor respuesta de inactivación.

Este diagrama muestra que las variables que influyen sobre la respuesta de inactivación de una manera significativa son el tipo de muestra utilizada, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la dosis de ozono. Por tanto, la adición de peróxido de hidrógeno sobre la muestra ozonizada repercute de manera positiva sobre los resultados de inactivación obtenidos.

### 6.2.3. Inactivación de *Enterococcus* sp.

#### 6.2.3.1. Resultados del tratamiento de ozonización

La Tabla 6.9 muestra los resultados derivados del análisis de los parámetros físico-químicos en muestras naturales antes y después de la aplicación del tratamiento de ozonización. No se observan variaciones en los parámetros evaluados. El pH se mantiene prácticamente constante durante el ensayo y la variación de la conductividad es baja.

Tabla 6.9. Resultados físico-químicos en el tratamiento de ozonización sobre la muestra natural de *Enterococcus* sp.

Tiempo (min)	pH	Conductividad ( $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ )
0	8,26	743
10	8,28	668

La Tabla 6.10 refleja las condiciones de trabajo establecidas durante el tratamiento de ozonización aplicado y en la Figura 6.12 se representa la curva de inactivación de *Enterococcus* sp. a lo largo del tratamiento sobre la muestra de agua natural. Al final del tratamiento se obtiene una inactivación final de 7,7 unidades logarítmicas.

Tabla 6.10. Recuentos de *Enterococcus* sp. y condiciones del tratamiento de ozonización sobre la muestra natural.

Tiempo (min)	0	1,3	2,5	7,1	12,3
$N_t$ (UFC 100mL <sup>-1</sup> )	$3,2 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^3$	$2,1 \cdot 10^2$	6
V muestra tomado (mL)	0	65	65	70	170
V actuación (L)	1	1	0,935	0,87	0,8
mg O <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> consumido	0	6	13,07	41,93	74,2

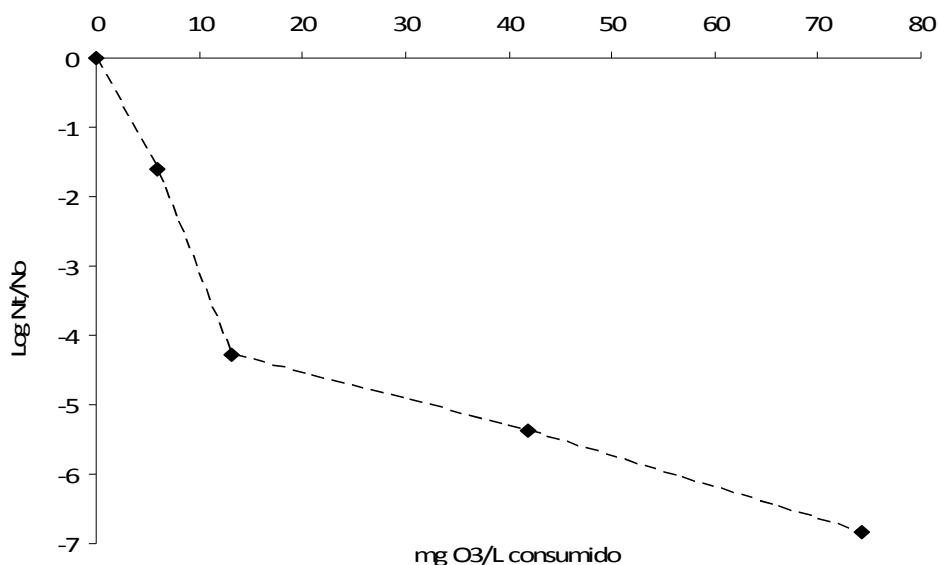


Figura 6.12. Inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de ozonización sobre la muestra natural.  $N_0 = 3,2 \cdot 10^8$  UFC·100mL<sup>-1</sup>.

Para alcanzar un nivel de inactivación de 4 órdenes de magnitud, la dosis de ozono necesaria es de 12,4 mg L<sup>-1</sup>, dosis muy superior a la requerida para obtener el mismo nivel de desinfección sobre *C. perfringens*.

Estableciendo como dosis de referencia 3 mg L<sup>-1</sup> de ozono, la eliminación de *Enterococcus* sp. alcanzada con este tratamiento es de 1,4 unidades logarítmicas, la mitad de la inactivación obtenida con respecto a *C. perfringens*. Por tanto, se observa una mayor resistencia al ozono de las poblaciones de *Enterococcus* sp. sobre las células vegetativas de *C. perfringens*.

### 6.2.3.2. Resultados del tratamiento peroxona

En la Tabla 6.11 se muestran los resultados de los parámetros físico-químicos obtenidos antes y después del tratamiento peroxona. El pH se mantiene prácticamente constante, mientras que hay una reducción importante en la conductividad.

La Tabla 6.12 refleja las condiciones de trabajo establecidas durante el ensayo aplicado y la Figura 6.13 muestra la curva de inactivación de *Enterococcus* sp. durante el tratamiento de peroxona.

Tabla 6.11. Resultados físico-químicos en el tratamiento de peroxona sobre la muestra natural de *Enterococcus* sp.

Tiempo (min)	pH	Conductividad (μs·cm <sup>-1</sup> )
0	8,26	743
10	8,31	484

Tabla 6.12. Recuentos de *Enterococcus* sp. y condiciones del tratamiento de peroxona sobre la muestra natural. [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=0,04 mM.

Tiempo (min)	0	1,1	2	6,2	12,3
N <sub>t</sub> (UFC 100mL <sup>-1</sup> )	4,7·10 <sup>8</sup>	1,2·10 <sup>5</sup>	6,2·10 <sup>3</sup>	1,9·10 <sup>1</sup>	4,0·10 <sup>0</sup>
V muestra tomado (mL)	0	200	210	200	210
V actuación (L)	1,5	1,5	1,3	1,09	0,89
mg O <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> consumido	0	4,1	9,46	33,85	69,1

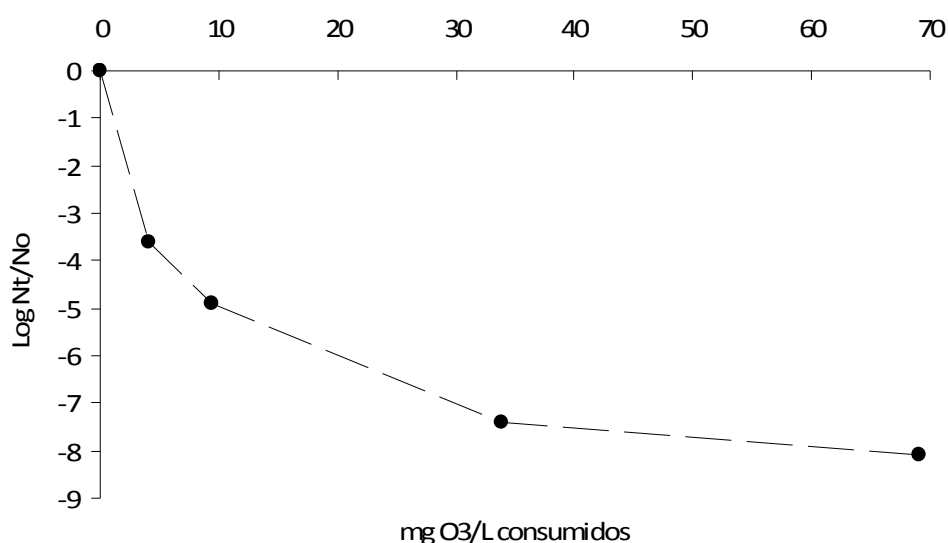


Figura 6.13. Inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de peroxona sobre la muestra natural.  $N_0 = 4,7 \cdot 10^8$  UFC·100mL<sup>-1</sup>. [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=0,04 mM.

A lo largo del ensayo se produce una reducción continuada de la población bacteriana alcanzando al finalizar el mismo una desinfección de 8 unidades logarítmicas. Esta rapidez de acción del tratamiento peroxona es también observada en el mismo tratamiento sobre *C. perfringens* (ver Tabla 6.4).

Si se establece un orden de inactivación de 4 unidades logarítmicas, se necesita una dosis de ozono de 5,7 mg L<sup>-1</sup> para alcanzarlo. Esta dosis es prácticamente la mitad de la dosis necesaria para alcanzar la misma desinfección con el tratamiento de ozonización. En consecuencia, se reitera el efecto positivo de la combinación del peróxido de hidrógeno y el ozono en la desinfección, como también establecen otras investigaciones sobre poblaciones de *E. coli* (Wolfe et al., 1989; Cho y Yoon, 2006; Sommer et al., 2004).

La inactivación de *Enterococcus* sp. alcanzada con una dosis de 3 mg L<sup>-1</sup> de O<sub>3</sub> en el sistema peroxona es de 2,7 unidades logarítmicas, inactivación superior a la alcanzada con el tratamiento de ozonización, aunque inferior a la obtenida con este mismo tratamiento sobre *C. perfringens*. Por tanto, *Enterococcus* sp. es más resistente al tratamiento peroxona que *C. perfringens* (células vegetativas).

### 6.2.3.3. Resultados del tratamiento de ozono combinado con TiO<sub>2</sub>

Los resultados derivados de los parámetros físico-químicos analizados antes y después del tratamiento de ozono combinado con TiO<sub>2</sub> se indican en la Tabla 6.13. El pH se mantiene prácticamente constante, mientras que hay una reducción en la conductividad, como también se observa en el tratamiento peroxona (Tabla 6.9).

Tabla 6.13. Resultados físico-químicos en el tratamiento de ozono combinado con TiO<sub>2</sub> sobre la muestra natural de *Enterococcus* sp.

Tiempo (min)	pH	Conductividad ( $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ )
0	8,26	743
10	8,14	564

La Tabla 6.14 refleja las condiciones de trabajo recogidas durante el ensayo realizado y la Figura 6.14 representa la curva de inactivación de *Enterococcus* sp. durante el tratamiento aplicado.

En la gráfica se observa cómo a partir del minuto 9, que corresponde a una dosis de 50,2 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>, se obtiene la desinfección completa de la muestra alcanzándose una eliminación de 7,8 unidades logarítmicas.

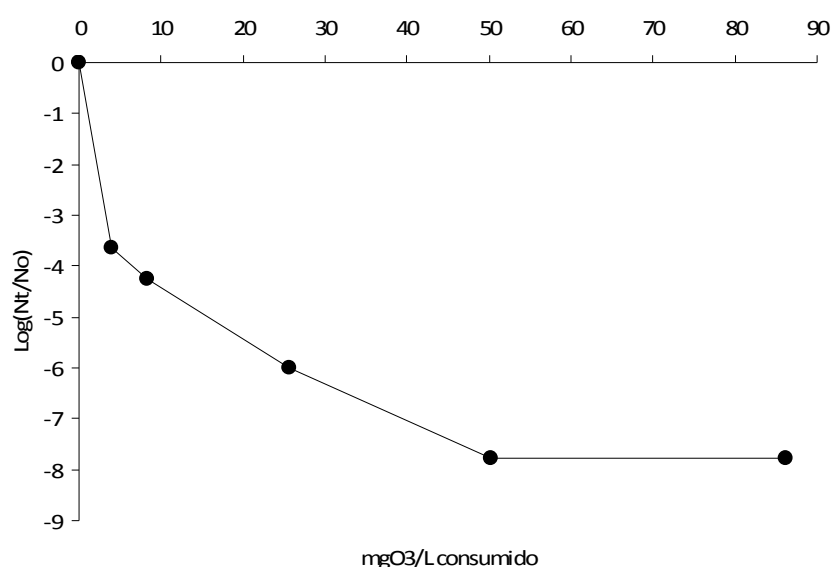
Para alcanzar un nivel de inactivación de 4 unidades logarítmicas, la dosis de ozono necesaria es 6,5 mg L<sup>-1</sup>, dosis inferior a la necesaria para el tratamiento de ozonización, pero ligeramente superior a la observada en el sistema peroxona.

En esta misma línea, tomando como referencia una dosis de ozono de 3 mg L<sup>-1</sup>, las poblaciones bacterianas iniciales se reducen en 2,7 unidades logarítmicas con el proceso de ozono combinado con TiO<sub>2</sub>, inactivación superior a la alcanzada en la ozonización pero similar a la obtenida en el sistema peroxona sobre *Enterococcus* sp.



Tabla 6.14. Recuentos de *Enterococcus* sp. y condiciones del tratamiento de ozono combinado con TiO<sub>2</sub> sobre la muestra natural. [TiO<sub>2</sub>]= 1 g L<sup>-1</sup>.

Tiempo (min)	0	1,1	1,8	4,8	9,1	15,3
N <sub>t</sub> (UFC 100mL <sup>-1</sup> )	6,2· 10 <sup>7</sup>	1,4· 10 <sup>4</sup>	3,5· 10 <sup>3</sup>	6,0· 10 <sup>1</sup>	0	0
V muestra tomado (mL)	0	85	50	200	215	215
V actuación (L)	1,5	1,5	1,415	1,365	1,165	0,950
mg O <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> consumido	0	3,9	8,27	25,71	50,21	86,21

Figura 6.14. Inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de ozono combinado con TiO<sub>2</sub> sobre la muestra natural. N<sub>0</sub>= 6,2·10<sup>7</sup> UFC·100mL<sup>-1</sup>. [TiO<sub>2</sub>]= 1 g L<sup>-1</sup>.

Con respecto a *C. perfringens*, se consigue una inactivación de 3,1 unidades logarítmicas con una dosis de 3 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>, resultando ser más sensible a la combinación de ozono y TiO<sub>2</sub> que *Enterococcus* sp.

#### 6.2.3.4. Resultados del tratamiento de O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub>

La Tabla 6.15 contiene los valores obtenidos de los parámetros físico-químicos de caracterización de la muestra antes y después del tratamiento conjunto O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub>. Se mantienen unos valores similares a los analizados al inicio del experimento. En la Tabla 6.16 se muestran las poblaciones bacterianas supervivientes a lo largo del experimento y las condiciones de operación del proceso.

Tabla 6.15. Resultados físico-químicos en el tratamiento de  $O_3/H_2O_2/TiO_2$  sobre la muestra natural de *Enterococcus* sp.  $[H_2O_2]=0,04mM$ .  $[TiO_2]=1 g L^{-1}$ .

Tiempo (min)	pH	Conductividad ( $\mu s \cdot cm^{-1}$ )
0	8,26	743
10	8,16	714

Tabla 6.16. Recuentos de *Enterococcus* sp. y condiciones del tratamiento de ozono combinado con  $TiO_2$  sobre la muestra natural.  $[H_2O_2]=0,04mM$ .  $[TiO_2]=1 g L^{-1}$ .

Tiempo (min)	0	1,1	1,8	4,8	9	15
UFC 100mL <sup>-1</sup>	$7,5 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^5$	$9,1 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	$6,7 \cdot 10^2$
V muestra tomado (mL)	0	45	65	200	200	210
V actuación (L)	1,5	1,5	1,455	1,390	1,190	0,990
mg $O_3 L^{-1}$ consumido	0	3,9	8,3	25,21	49,28	82,96

La Figura 6.15 representa la curva de inactivación de *Enterococcus* sp. durante el tratamiento. Se observa una caída inicial brusca de las poblaciones, seguida de un periodo de inactivación más lento que finaliza con una reducción bacteriana de 5 unidades logarítmicas.

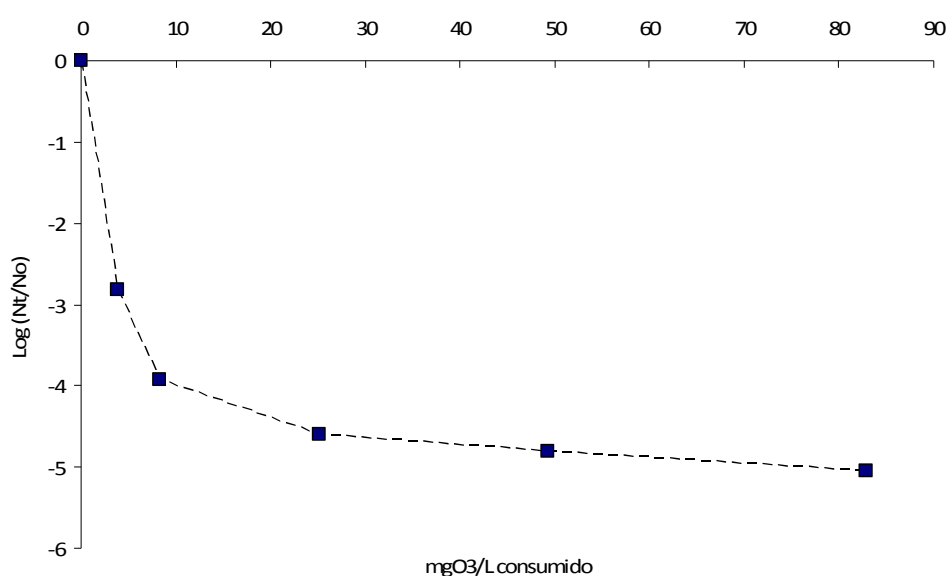


Figura 6.15. Inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento  $O_3/H_2O_2/TiO_2$  sobre la muestra natural.  $N_0=7,5 \cdot 10^7$  UFC·100mL<sup>-1</sup>.  $[H_2O_2]=0,04mM$ .  $[TiO_2]=1 g L^{-1}$ .

Con una dosis de referencia de 3 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>, la reducción logarítmica alcanzada en este tratamiento es de 2,2 unidades logarítmicas, inactivación superior a la obtenida con el ozono por si solo, pero inferior a la conseguida con los procesos de peroxona y ozonización catalítica.

En consecuencia, la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y TiO<sub>2</sub> por separado y en conjunto, mejoran la desinfección obtenida con respecto al tratamiento de ozonización en solitario, si bien esta combinación no supone una mejora sobre los tratamientos peroxona y O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub>, ni desde el punto de vista de inactivación ni desde el punto de vista de dosis de ozono consumida.

#### 6.2.3.5. Estudio de influencia de variables

Con el objeto de estudiar la influencia de las diversas variables que participan en los tratamientos de desinfección basados en ozono aplicados sobre *Enterococcus* sp., se sigue la metodología descrita en el apartado 3.4.1. El factor respuesta establecido es la inactivación logarítmica de las poblaciones bacterianas.

Se utiliza un nivel de confianza del 95% para el análisis de resultados, centrado en el estudio de las variables dosis de ozono, TiO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los niveles escogidos para cada una de las variables se muestran en la Tabla 6.17.

Tabla 6.17. Niveles de las variables en los tratamientos de ozono sobre *Enterococcus* sp.

Variable	Nivel
Dosis de ozono	3 mg L <sup>-1</sup> /10 mg L <sup>-1</sup>
TiO <sub>2</sub>	ausencia/presencia
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ausencia/presencia

En la Figura 6.16 se representa la influencia de cada una de las variables sobre la inactivación logarítmica de *Enterococcus* sp. La dosis de ozono es la variable que mayor efecto tiene sobre el nivel de inactivación alcanzado, pues presenta la pendiente mayor y además, el efecto es positivo. El efecto del resto de las variables sobre el factor respuesta es mínimo.

Tras determinar la influencia de cada una de las variables seleccionadas, se representa en la Figura 6.17 su interacción. La interacción más significativa corresponde a la interacción  $[\text{TiO}_2][\text{H}_2\text{O}_2]$ , ya que sus líneas se cortan. Se observa que en presencia de  $\text{TiO}_2$  se obtiene una inactivación mayor cuando no está presente el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y viceversa, por lo que entre estas dos variables se observa una interacción negativa, bajo las condiciones de estudio.

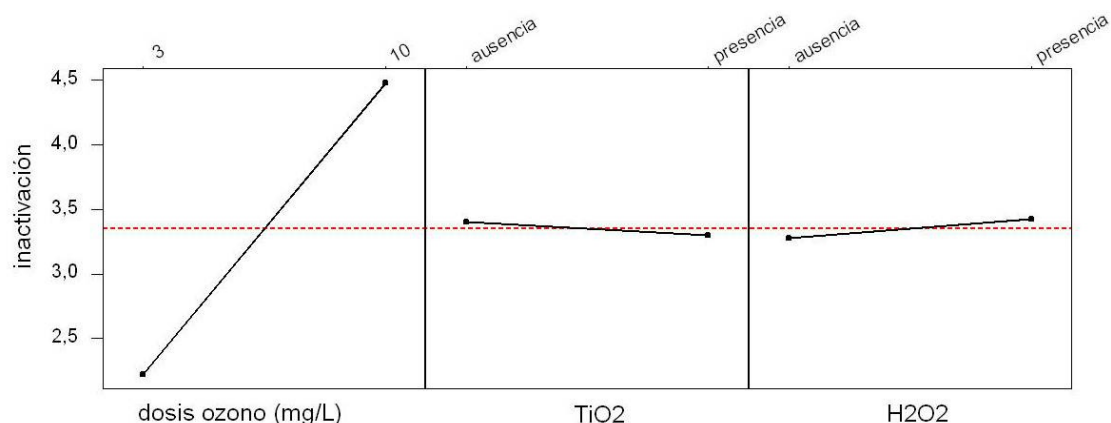


Figura 6.16. Influencia de las variables seleccionadas en los procesos de ozono sobre *Enterococcus* sp.

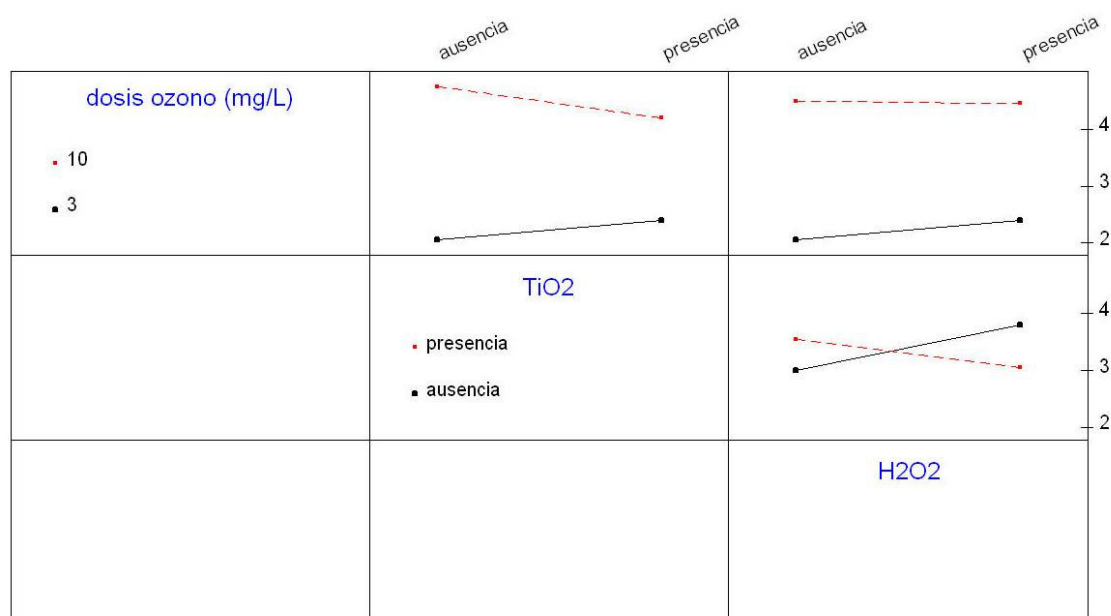


Figura 6.17. Representación gráfica de las interacciones entre las variables utilizadas en los tratamientos de ozonización sobre *Enterococcus* sp.

Finalmente, para conocer qué variables e interacciones son significativas en la inactivación de *Enterococcus* sp., se representa en la Figura 6.18 el diagrama de Pareto. Éste muestra que la variable que influye sobre la respuesta de inactivación de una manera significativa es la dosis de ozono.

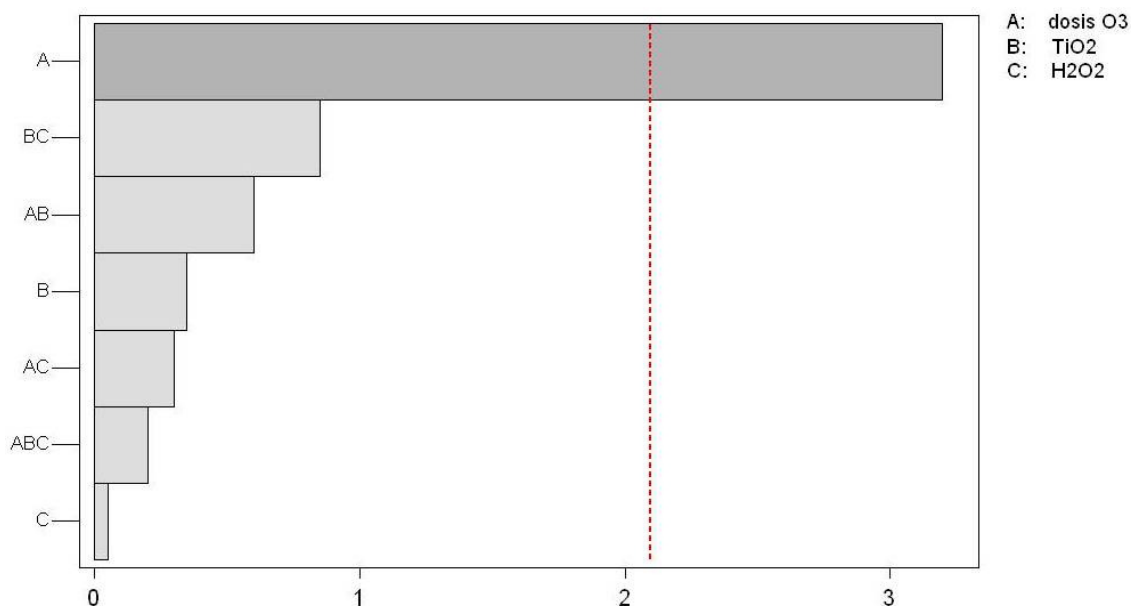


Figura 6.18. Diagrama de Pareto en el que se muestran los efectos significativos sobre el factor respuesta de inactivación.

#### 6.2.4. Modelización cinética

Los datos experimentales de las curvas de inactivación de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp. obtenidos durante los tratamientos de ozonización, peroxona, ozono combinado con dióxido de titanio y O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub>, se analizan a través de 3 modelos matemáticos, el modelo de Hom, el modelo bifásico y el modelo de Mafart. Se incorpora un modelo más, el modelo de Geeraerd, en dos tratamientos de *C. perfringens* por presentar una forma de inactivación sigmoidea, es decir, con hombro y cola.

Dos de los modelos matemáticos utilizados, el modelo bifásico y el de Mafart, coinciden con los modelos seleccionados para el tratamiento de cloración, pero los tres coinciden con los utilizados en los tratamientos de irradiación. Se sustituye el modelo de Hom modificado, utilizado en la etapa de cloración, por el modelo de Hom, debido a las condiciones de operación del experimento. Se suministra ozono de manera continua y constante al reactor que alberga la muestra, por lo que se considera que la

concentración de ozono aplicada es constante, mostrando consonancia con los fundamentos del modelo de Hom el cual no asume una disminución del desinfectante a lo largo del tratamiento. En el apartado 3.4.3 de la presente memoria se desarrollan con más detalle cada uno de estos modelos.

Las Tablas 6.18, 6.19 y 6.20 recogen los valores de los parámetros cinéticos obtenidos tras aplicar los modelos matemáticos seleccionados sobre las curvas de inactivación de las células vegetativas de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp. durante los tratamientos de ozonización, peroxona y ozono combinado con TiO<sub>2</sub>, respectivamente. Los mismos parámetros calculados para el tratamiento de O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> sobre *Enterococcus* sp. se visualizan en la Tabla 6.21.

Tabla 6.18. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de las dos formas bacterianas de estudio en el tratamiento de ozonización.

Modelo de Hom					
	$k_{ap} (\text{min}^{-1} \cdot \text{mg L}^{-1})$	$m$	ECM	$R^2$	
<i>C. perfringens</i>	2,623	0,36	1,13	0,78	
<i>Enterococcus</i> sp.	3,001	0,26	0,69	0,94	
Modelo bifásico					
	$P$	$k_1 (\text{min}^{-1})$	$k_2 (\text{min}^{-1})$	ECM	$R^2$
<i>C. perfringens</i>	0,99997	7,990	0,226	0,77	0,91
<i>Enterococcus</i> sp.	0,999993	3,862	0,185	0,49	0,98
Modelo de Mafart					
	$p$	$\delta (\text{min})$	ECM	$R^2$	
<i>C. perfringens</i>	0,36	0,07	1,14	0,78	
<i>Enterococcus</i> sp.	0,23	0,002	0,74	0,93	
Modelo de Geeraerd					
	$SI$	$K_{max} (\text{min}^{-1})$	ECM	$R^2$	
<i>C. perfringens</i>	0,53	20,83	0,36	0,98	

Los valores de los índices de ajuste, ECM y  $R^2$ , en los tratamientos aplicados son bastante buenos, pues tienen valores cercanos a 1 en el caso del coeficiente de correlación ( $R^2$ ) y valores cercanos a 0 en el caso del error cuadrático medio (ECM), a excepción de los índices de los modelos Hom y Mafart en los tratamientos de

ozonización y  $O_3/TiO_2$  para *C. perfringens*, donde el valor  $R^2$  está muy alejado del valor óptimo.

Comparando los valores de los parámetros cinéticos obtenidos para cada una de las formas bacterianas entre los distintos tratamientos aplicados se observa que, en el caso de *C. perfringens*, los valores de las constantes de velocidad de inactivación ( $k_{ap}$  en el modelo de Hom y la  $k_1$  en el modelo bifásico para la subpoblación sensible) son superiores en el tratamiento de la peroxona que en los tratamientos de ozonización y  $O_3/TiO_2$ , por ser la peroxona el más efectivo en la eliminación de *C. perfringens*. El parámetro  $\delta$  del modelo de Mafart, que indica el tiempo necesario para conseguir 1 unidad logarítmica, es muy inferior en el tratamiento de peroxona con respecto al valor obtenido en los tratamientos de ozono y  $O_3/TiO_2$ . Del modelo bifásico se deriva que la población resistente de *C. perfringens* en el tratamiento de peroxona aparece después de inactivarse 5,4 ciclos logarítmicos, en el tratamiento de  $O_3/TiO_2$  después de 5,3 ciclos y en la ozonización, tras 4,6 unidades logarítmicas. De estas valoraciones se deriva que las poblaciones vegetativas de *C. perfringens* son más sensibles al tratamiento de peroxona, seguidas del tratamiento  $O_3/TiO_2$  y ozono.

Tabla 6.19. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de las dos formas bacterianas de estudio en el tratamiento de peroxona.

Modelo de Hom					
	$k_{ap} (\text{min}^{-1} \cdot \text{mg L}^{-1})$	$m$		ECM	$R^2$
<i>C. perfringens</i>	5,346	0,05		0,08	0,99
<i>Enterococcus sp.</i>	4,321	0,21		0,58	0,96
Modelo bifásico					
	$P$	$k_1 (\text{min}^{-1})$	$k_2 (\text{min}^{-1})$	ECM	$R^2$
<i>C. perfringens</i>	0,999996	12,83	0,17	0,27	0,99
<i>Enterococcus sp.</i>	0,999998	5,98	0,24	0,94	0,95
Modelo de Mafart					
	$p$	$\delta (\text{min})$		ECM	$R^2$
<i>C. perfringens</i>	0,07	$5 \cdot 10^{-11}$		0,10	0,99
<i>Enterococcus sp.</i>	0,21	0,001		0,58	0,96

Tabla 6.20. Parámetros cinéticos de los modelos matemáticos aplicados sobre la inactivación de las dos formas bacterianas de estudio en el tratamiento de O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub>.

Modelo de Hom					
	$k_{ap}$ (min <sup>-1</sup> · mg L <sup>-1</sup> )	m		ECM	R <sup>2</sup>
<i>C. perfringens</i>	2,77	0,36		0,90	0,86
<i>Enterococcus</i> sp.	4,072	0,22		0,58	0,95
Modelo bifásico					
	P	$k_1$ (min <sup>-1</sup> )	$k_2$ (min <sup>-1</sup> )	ECM	R <sup>2</sup>
<i>C. perfringens</i>	0,999995	8,78	0,25	1,05	0,96
<i>Enterococcus</i> sp.	0,9999991	6,04	0,19	0,94	0,94
Modelo de Mafart					
	p	$\delta$ (min)		ECM	R <sup>2</sup>
<i>C. perfringens</i>	0,37	0,06		0,90	0,86
<i>Enterococcus</i> sp.	0,22	0,001		0,58	0,95
Modelo de Geeraerd					
	SI	$K_{max}$ (min <sup>-1</sup> )		ECM	R <sup>2</sup>
<i>C. perfringens</i>	0,41	15,33		0,21	0,99

Tabla 6.21. Parámetros cinéticos del modelo de Hom, modelo bifásico y modelo de Mafart aplicados sobre la inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Modelo de Hom				
$k_{ap}$ (min <sup>-1</sup> · mg L <sup>-1</sup> )	m		ECM	R <sup>2</sup>
3,180	0,19		0,26	0,97
Modelo bifásico				
P	k <sub>1</sub> (min <sup>-1</sup> )	k <sub>2</sub> (min <sup>-1</sup> )	ECM	R <sup>2</sup>
0,99991	5,93	0,18	0,16	0,99
Modelo de Mafart				
p	δ (min)		ECM	R <sup>2</sup>
0,19	0,002		0,26	0,97

Con respecto a *Enterococcus* sp., los valores de las constantes de velocidad de inactivación ( $k_{ap}$  en el modelo de Hom y  $k_1$  y  $k_2$  en el modelo bifásico) son inferiores en el tratamiento de ozonización con respecto a los tratamientos peroxona, O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> y O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub>. El valor del parámetro  $\delta$  del modelo de Mafart es inferior en los tratamientos de peroxona y O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub>, por lo que alcanzan la unidad logarítmica de



inactivación en menor tiempo que en el proceso de ozonización, cuyo valor coincide con el obtenido en el tratamiento  $O_3/H_2O_2/TiO_2$ .

Las Figuras 6.19 y 6.20 reflejan de manera gráfica los ajustes de los modelos aplicados sobre las curvas de inactivación de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp., respectivamente, frente a los distintos tratamientos estudiados.

Otra forma de visualizar la bondad del ajuste de los modelos aplicados sobre los resultados obtenidos de manera experimental es representar gráficamente los valores de inactivación observados frente a los valores de inactivación estimados, tal y como muestran las Figuras 6.25-6.31.

Sobre *C. perfringens*, todos los modelos representados para los tres tratamientos de ozono estudiados (Figuras 6.21, 6.22 y 6.23) muestran una nube de puntos cercana a la recta, si bien cabe destacar el mejor ajuste del modelo de Geeraerd en los tratamientos de ozonización y  $O_3/TiO_2$  (Tabla 6.18 y 6.20), presentando más proximidad de los puntos sobre dicha recta. Respecto a *Enterococcus* sp., no destaca ningún modelo sobre otro, mostrando todos ellos una distribución de la nube de puntos similar, en los cuatro tratamientos de ozono modelizados (Figuras 6.24, 6.25, 6.26 y 6.27).

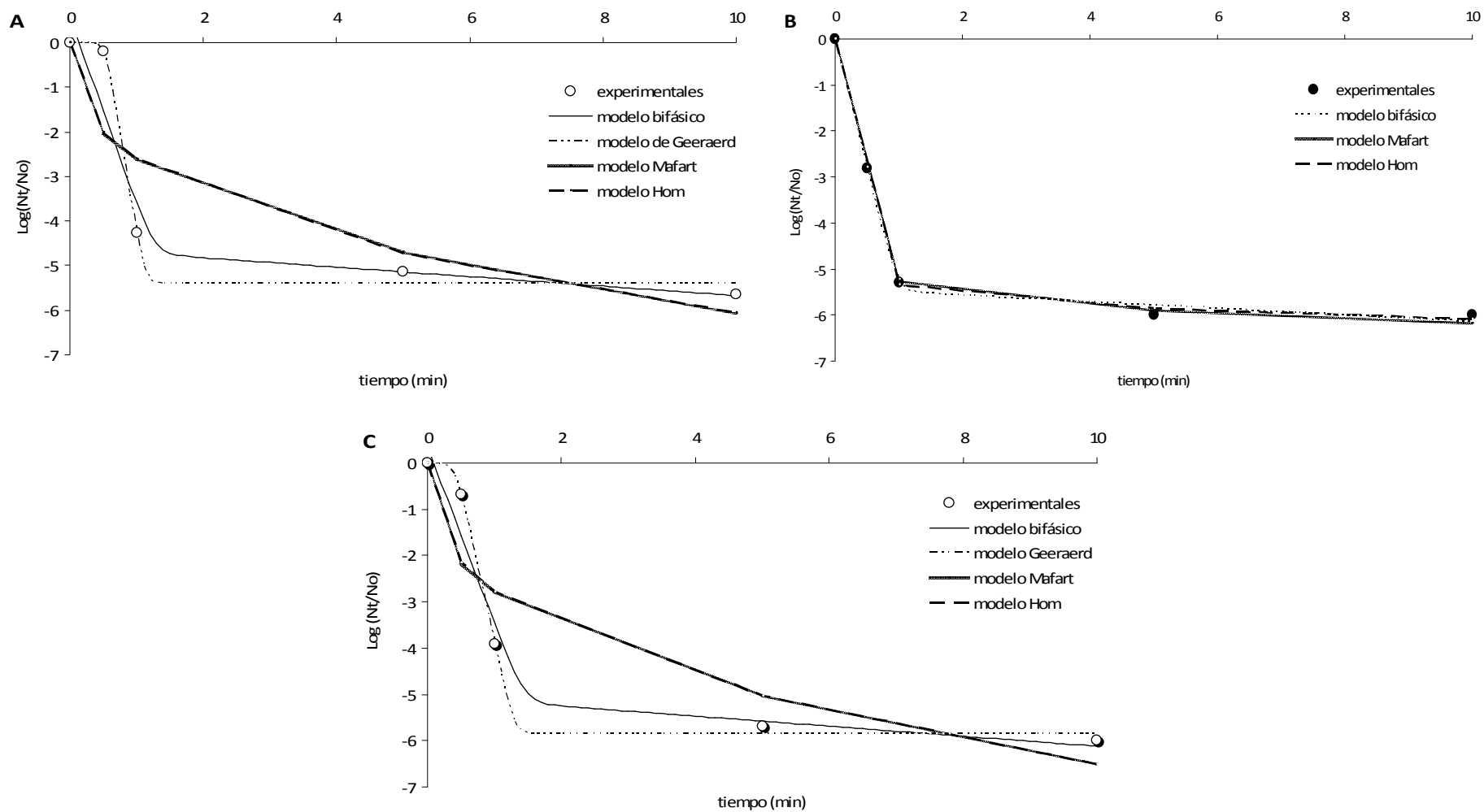


Figura 6.19. Ajuste de los cuatro modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de las células vegetativas de *C. perfringens* en los tratamientos de ozonización (A), peroxona (B) y  $\text{O}_3/\text{TiO}_2$  (C).

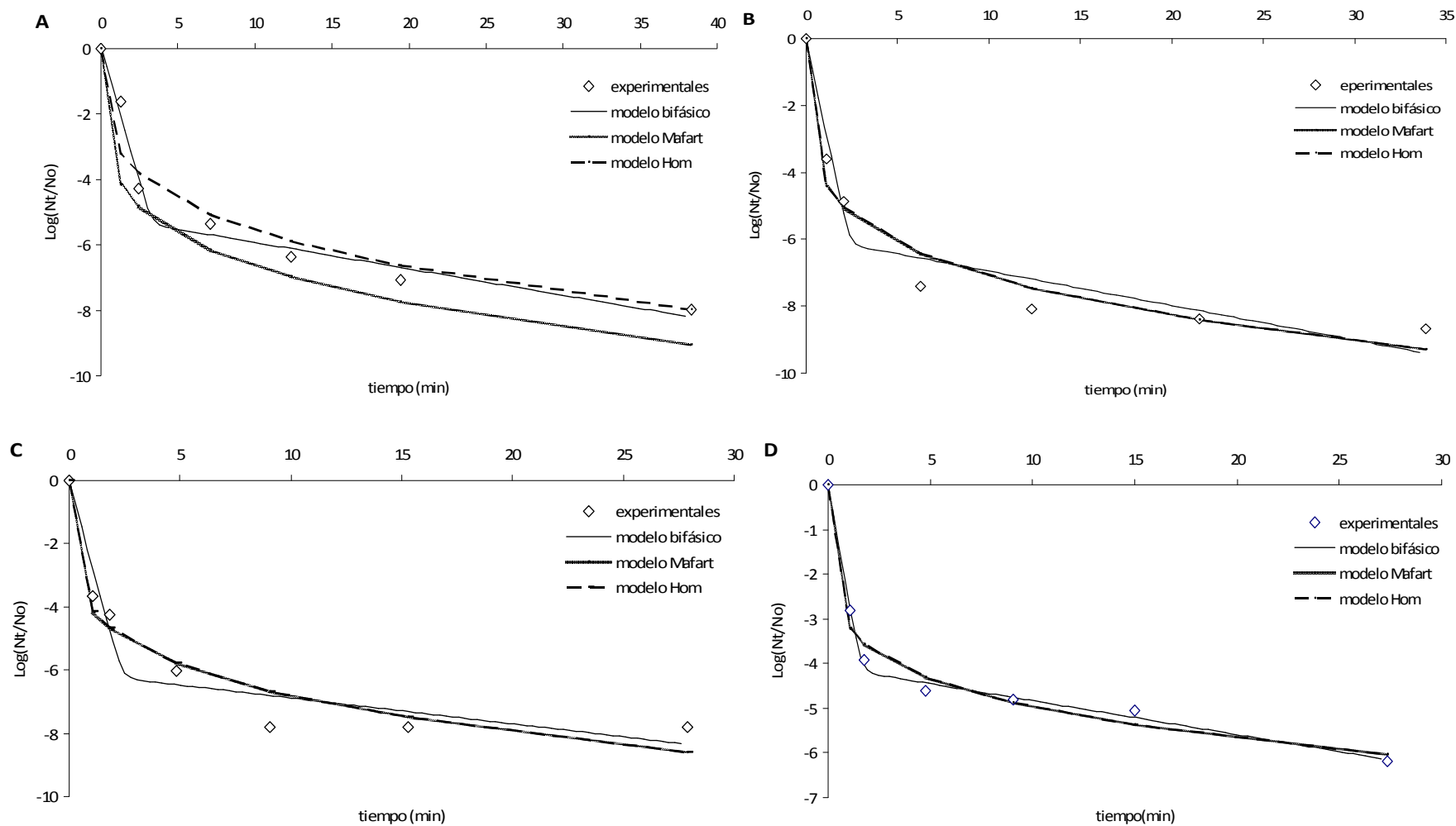


Figura 6.20. Ajuste de los cuatro modelos matemáticos a la gráfica de inactivación de *Enterococcus* sp. en los tratamientos de ozonización (A), peroxona (B),  $\text{O}_3/\text{TiO}_2$  (C) y  $\text{O}_3/\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$  (D).

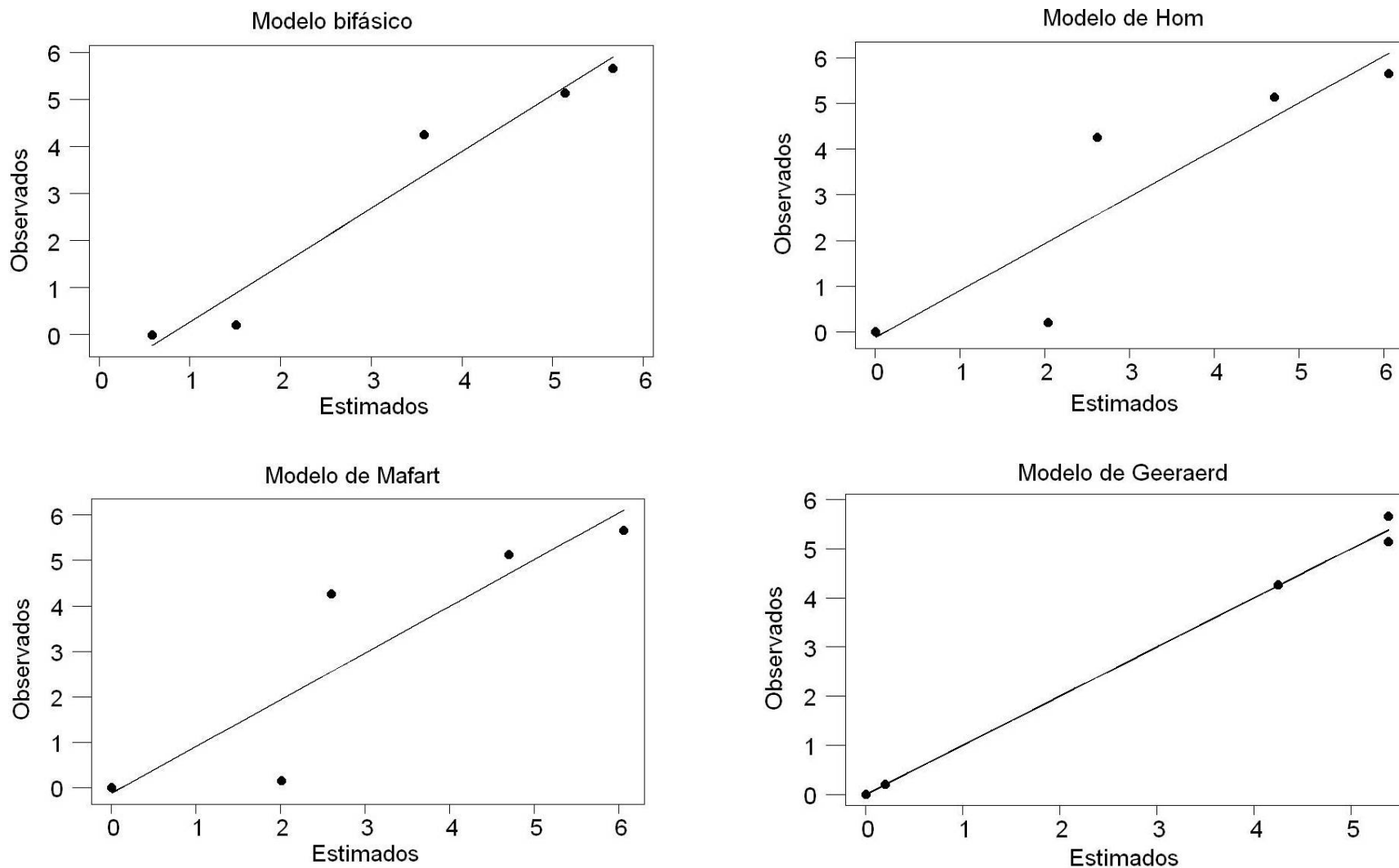


Figura 6.21. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de *C. perfringens* en el tratamiento de ozonización.

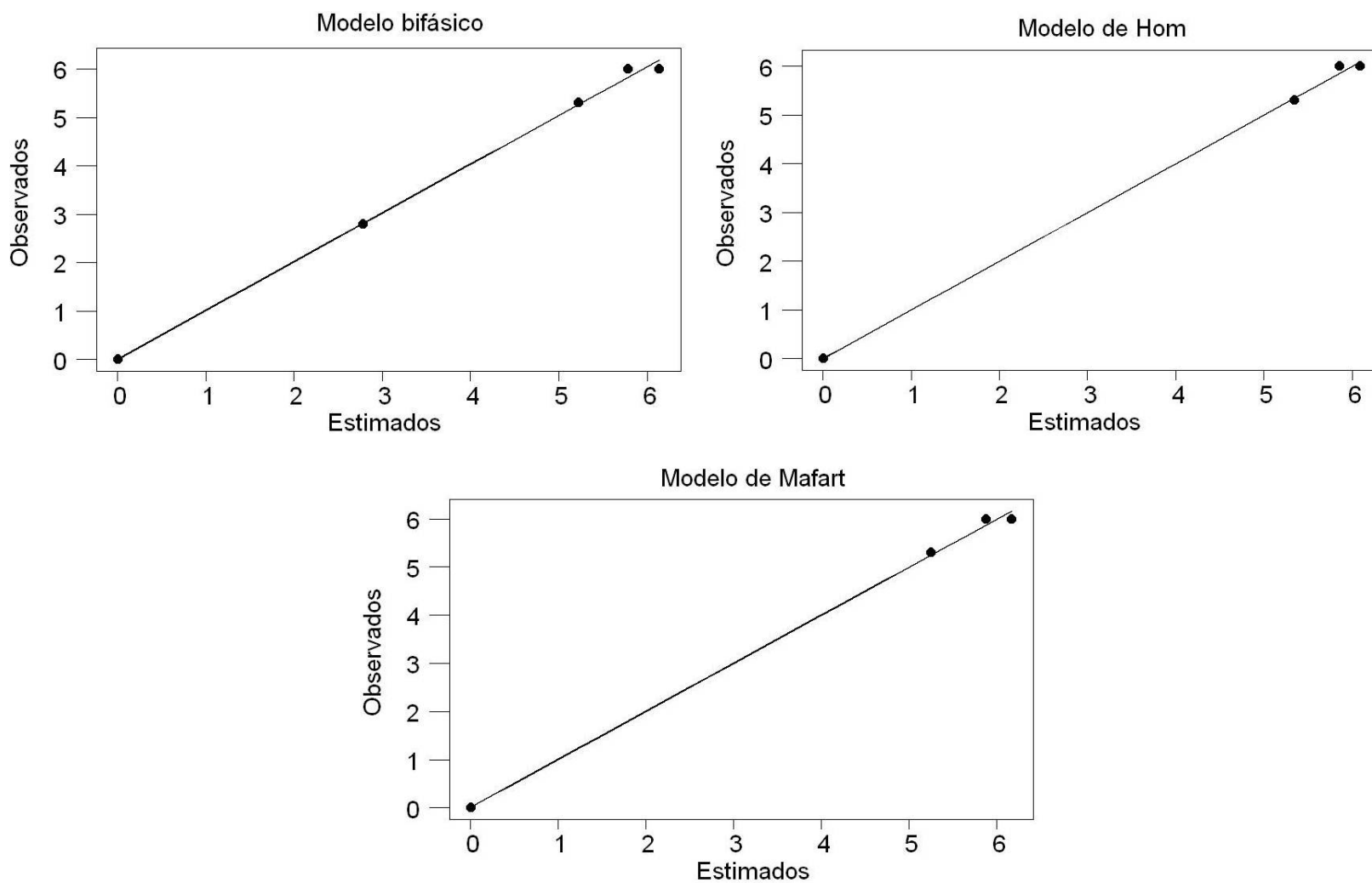


Figura 6.22. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de *C. perfringens* en el tratamiento de peroxona.

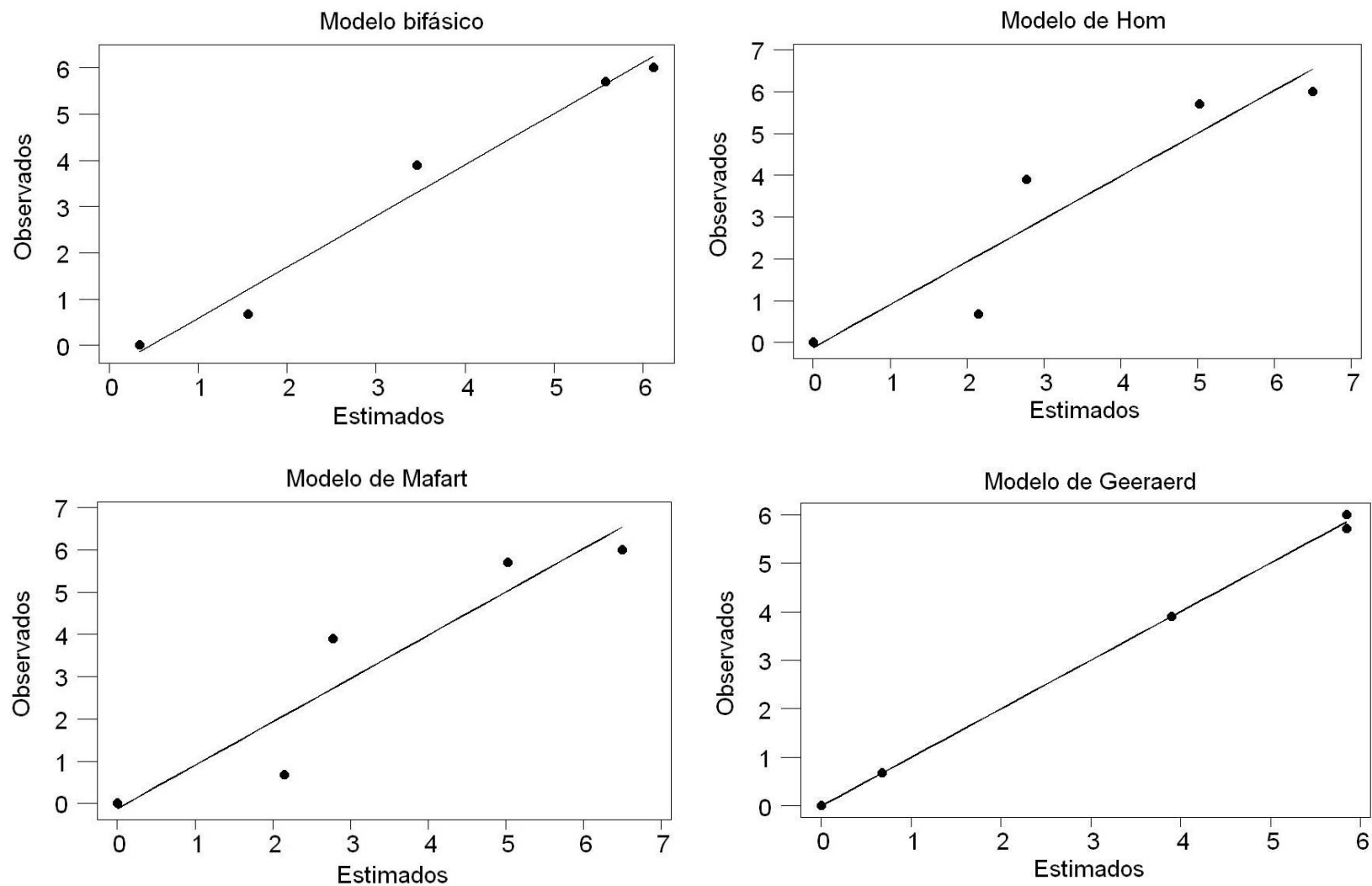


Figura 6.23. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de *C. perfringens* en el tratamiento de  $O_3/TiO_2$ .

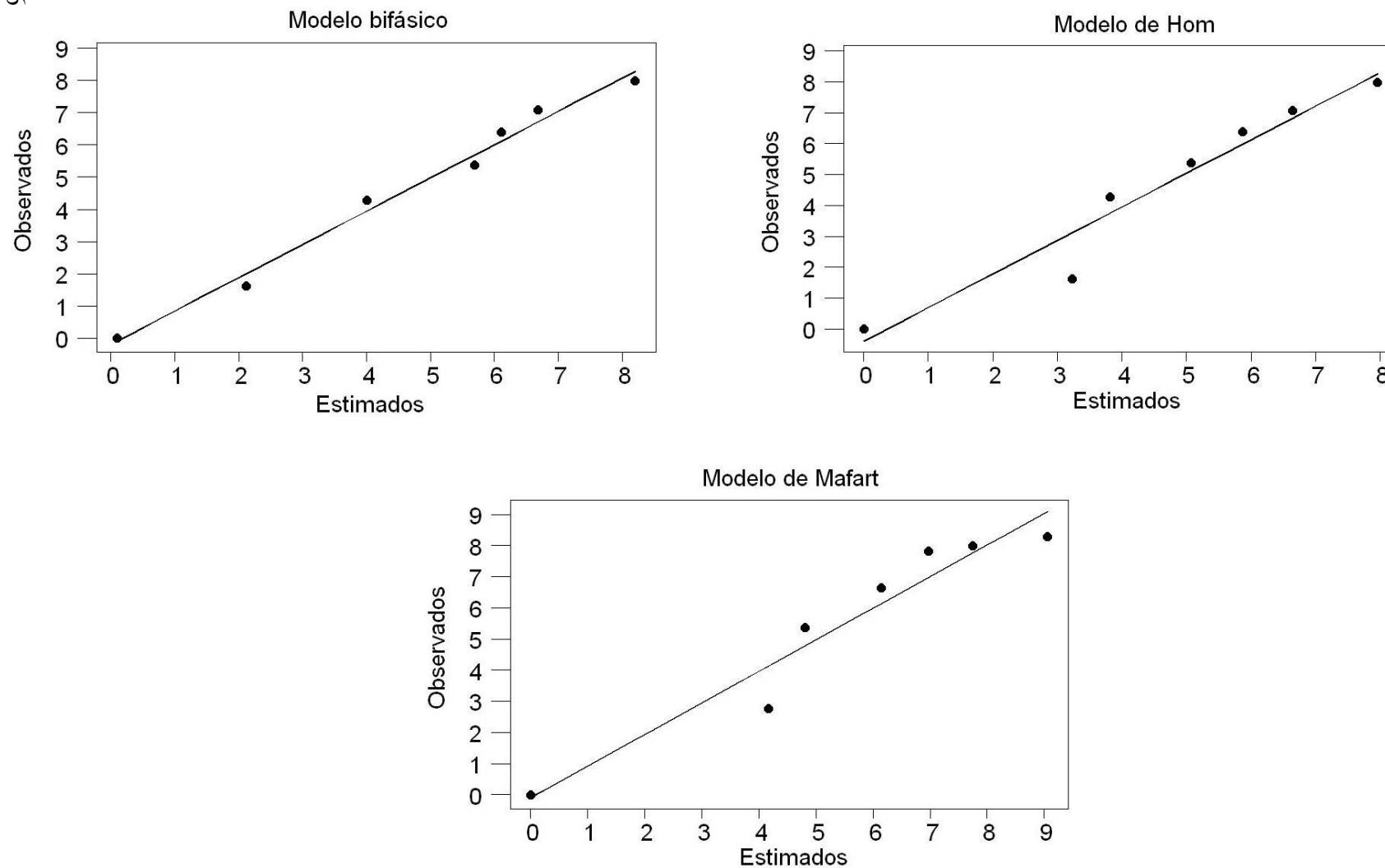


Figura 6.24. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de ozonización.

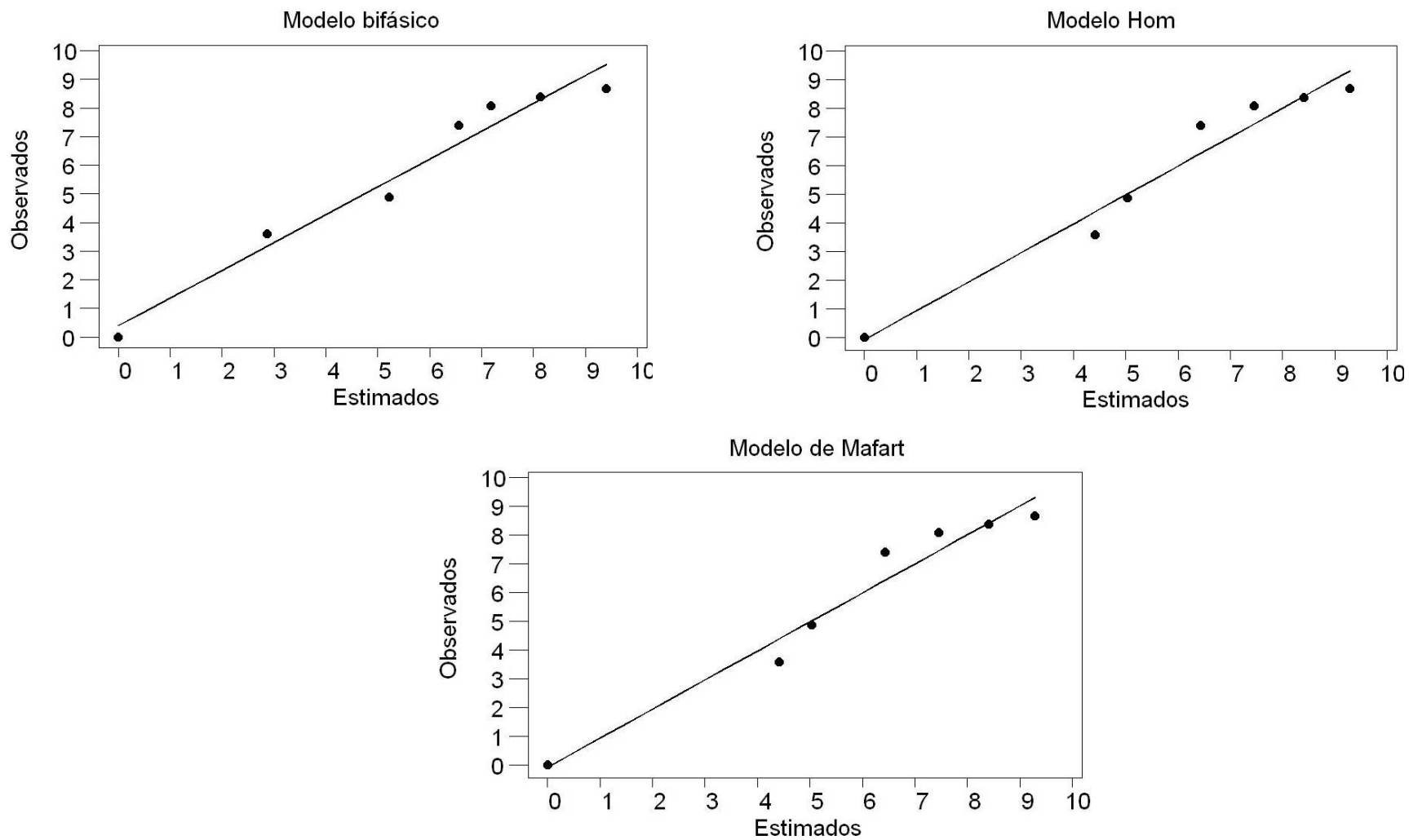


Figura 6.25. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de peroxona.



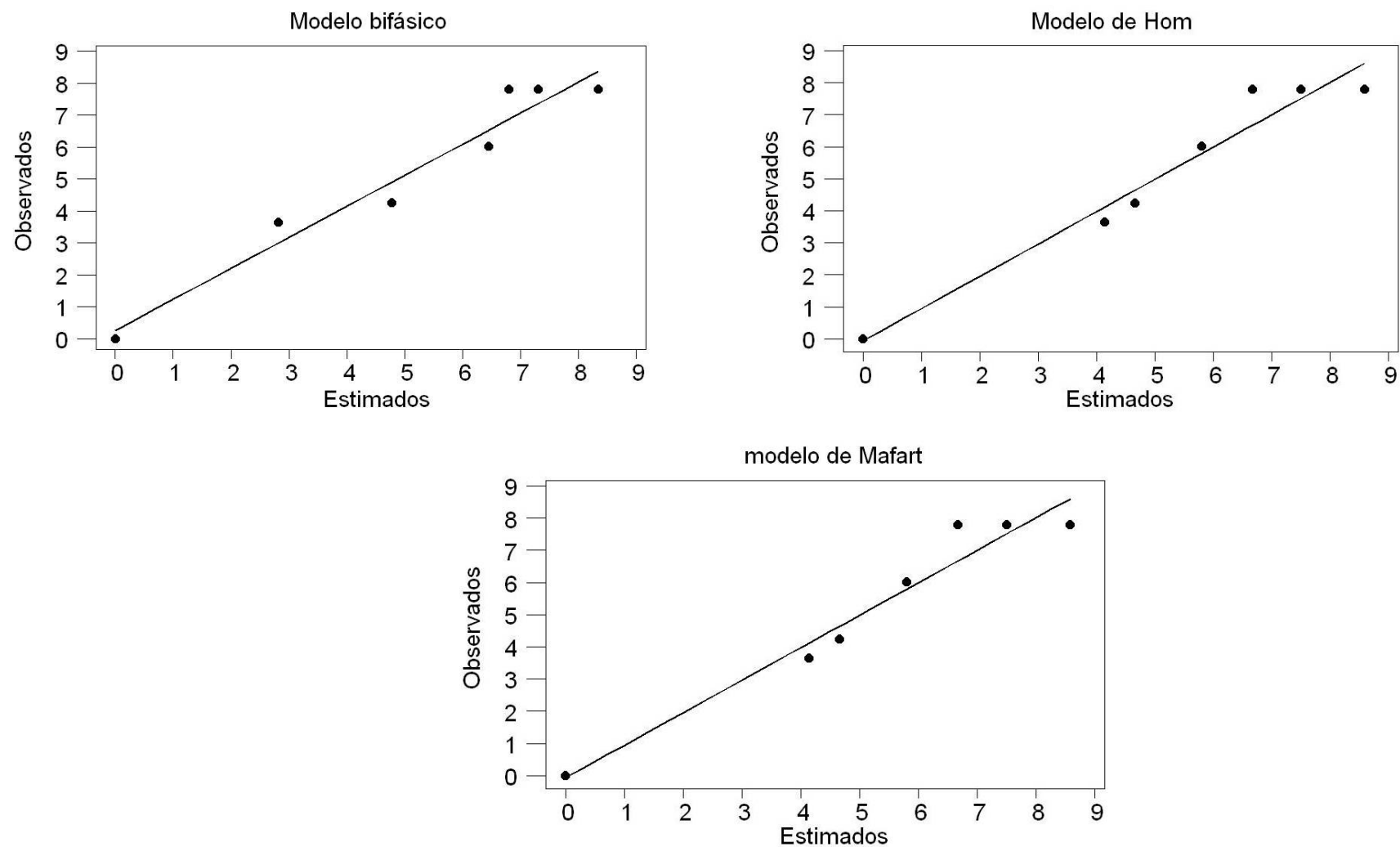


Figura 6.26. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de  $O_3/TiO_2$ .

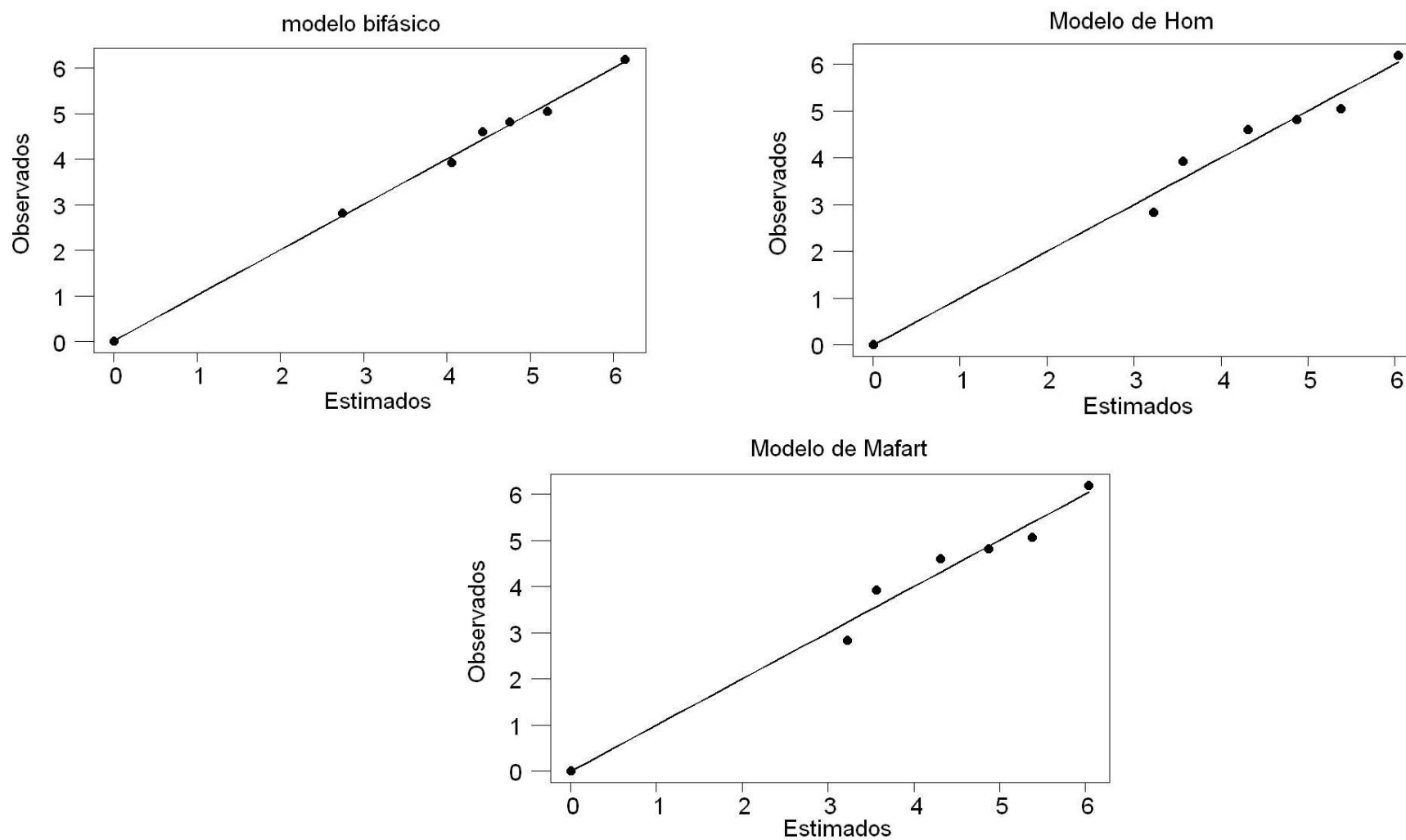


Figura 6.27. Representación de la correlación entre los valores observados experimentalmente y los valores estimados por los modelos cinéticos aplicados en la inactivación de *Enterococcus* sp. en el tratamiento de  $O_3/TiO_2/H_2O_2$ .

### 6.3. Estudio económico

Para estimar los costes de los tratamientos basados en ozono, se consideran los costes relativos a los agentes empleados y los costes del consumo de electricidad requerida por el ozonizador. Los agentes implicados son el ozono, el peróxido de hidrógeno y el dióxido de titanio, cuyos costes se recogen en la Tabla 6.22.

Los cálculos se realizan para alcanzar un nivel de inactivación de 1 unidad logarítmica (90 % de inactivación), con el objetivo de poder comparar los costes entre los diferentes tratamientos estudiados.

Tabla 6.22. Coste de los agentes utilizados en los tratamientos de ozonización.

Agente	Precio	Fuente/Empresa
O <sub>3</sub>	Coste aporte oxígeno: 0,025 €/kg O <sub>2</sub> Coste electricidad <sup>1</sup> : 0,1095 €/KWh	Lucas et al., 2010
TiO <sub>2</sub>	1,55 €/Kg	Degussa Ibérica S.A.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	0,21€/Kg	FCM Foret, Zaragoza

<sup>1</sup>El ozonizador consume 12 Wh/g ozono producido, cuando se alimenta con oxígeno.

En la Tabla 6.23 se indican los costes estimados del tratamiento teniendo de referencia los distintos indicadores bacterianos estudiados y a continuación, la expresión utilizada para realizar el cálculo:

- Ozonización: coste oxígeno (coste · dosis oxígeno·densidad) + coste electricidad:  

$$[[0,025 \text{ €/kg} \cdot (100 \text{ L/h} \cdot \text{minutos tratamiento}/60) \cdot 0,0013 \text{ kg/L}] + [(0,1095 \text{ €/KWh} \cdot 12 \cdot 10^{-3} \text{ KW} \cdot \text{h/g O}_3 \cdot \text{mg O}_3 \cdot 10^{-3} \text{ /L})] \text{ €/L}] \cdot 1000 \text{ €/m}^3$$
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: dosis · riqueza · coste:  

$$0,04 \cdot 10^{-6} \text{ kg/L} \cdot \frac{100}{0,3} \cdot 0,21 \text{ €/kg} = 2,8 \cdot 10^{-6} \text{ €/L} = 0,0028 \text{ €/m}^3$$
- TiO<sub>2</sub> (1g/L): dosis · coste  

$$1 \cdot 10^{-3} \text{ kg/L} \cdot 1,55 \text{ €/kg} = 1,55 \cdot 10^{-3} \text{ €/L} = 1,55 \text{ €/m}^3$$

Tabla 6.23. Costes del tratamiento de ozonización, peroxona,  $O_3/TiO_2$  y  $O_3/TiO_2/H_2O_2$  para la inactivación de un 1 unidad logarítmica sobre *C. perfringens* (células vegetativas) y *Enterococcus* sp.

Tratamiento	Microorganismo	Coste (€ m <sup>-3</sup> )
Ozonización	Cél. vegetativas	0,039
	<i>Enterococcus</i> sp.	0,041
Peroxona	Cél. vegetativas	0,017
	<i>Enterococcus</i> sp.	0,007
$O_3/TiO_2$	Cél. vegetativas	1,584
	<i>Enterococcus</i> sp.	1,554
$O_3/TiO_2/H_2O_2$	<i>Enterococcus</i> sp.	1,578

Se vuelve a observar que los tratamientos que suponen un mayor coste son aquellos que utilizan dióxido de titanio, ya que supone el reactivo más caro. El coste asociado al tratamiento peroxona es menor que el calculado para la ozonización y es que a pesar de contar con el añadido de  $H_2O_2$ , al utilizarse menos dosis de ozono por ser el tratamiento peroxona más rápido y efectivo que el tratamiento de ozonización, resulta en definitiva más barato.



Capítulo 7.

Conclusiones

---



Para finalizar este trabajo de Tesis, en este capítulo se presentan las principales conclusiones extraídas consecuencia de los resultados obtenidos, tanto a nivel general como a nivel particular, relativos a cada uno de los tratamientos investigados.

### 7.1. Conclusiones generales

- ♦ Se puede conseguir eliminar de las aguas *Clostridium perfringens* y *Enterococcus* sp. de manera eficaz usando POAs de manera alternativa a los procesos de cloración convencional.
- ♦ Las células vegetativas de *C. perfringens* presentan una mayor sensibilidad que *Enterococcus* sp. y a su vez, que sobre sus formas esporuladas frente a los tratamientos de oxidación avanzada.
- ♦ La presencia de materia orgánica disminuye la efectividad de los tratamientos aplicados.
- ♦ La radiación UVB presenta un elevado poder bactericida. La presencia de esta radiación en el tratamiento enmascara cualquier efecto producido por los otros agentes oxidantes estudiados.
- ♦ Es necesaria la activación del dióxido de titanio mediante una fuente de irradiación adecuada ( $\lambda < 385$  nm) para que participe activamente en el fenómeno de desinfección.
- ♦ La combinación de irradiación UV/VIS ( $\lambda > 320$  nm) con dióxido de titanio o con peróxido de hidrógeno mejora de manera sustancial la desinfección obtenida sobre *C. perfringens* y *Enterococcus* sp. respecto al tratamiento de irradiación por si solo.
- ♦ La combinación de ozono con dióxido de titanio o con peróxido de hidrógeno mejora los resultados de inactivación obtenidos sobre *C. perfringens* y *Enterococcus* sp. en relación al tratamiento de ozonización en solitario.
- ♦ El dióxido de titanio no interacciona de manera positiva con el peróxido de hidrógeno.
- ♦ Los modelos matemáticos primarios de Hom, Hom modificado, bifásico, Mafart y Geeraerd describen adecuadamente las cinética de desinfección de los



tratamientos de cloración, ozonización y de irradiación UV/VIS estudiados, sobre células vegetativas y esporos de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp.

- ♦ En relación a los costes asociados, para obtener 1 unidad logarítmica de inactivación, el tratamiento de cloración es el que resulta el más económico, seguido de los tratamientos basados en ozono, siendo los más caros aquellos en los que interviene el dióxido de titanio.

## 7.2. Conclusiones particulares

### Eliminación de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp. mediante tratamientos convencionales

- ♦ El tratamiento convencional de potabilización a escala real cumple con los criterios de desinfección exigidos por el RD 140/2003 en base al análisis de los parámetros microbiológicos *C. perfringens* y *Enterococcus* sp., si bien las etapas que mayor grado de eliminación suponen son la preoxidación y oxidación intermedia, seguidas de la coagulación- floculación.
- ♦ A escala laboratorial, la etapa de cloración es la responsable de la mayor parte de la eliminación de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp., seguida de la etapa de filtración.
- ♦ Las etapas de coagulación-floculación y decantación y adsorción con carbón activo no influyen mucho en la reducción de las poblaciones de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp. con respecto al resto de las operaciones.
- ♦ Las poblaciones esporuladas de *C. perfringens* presentan una mayor resistencia al cloro que sus formas vegetativas.
- ♦ *C. perfringens* (tanto en su forma vegetativa como esporulada) se ve menos afectada por las concentraciones residuales de cloro que *Enterococcus* sp.
- ♦ Las curvas de inactivación de *C. perfringens*, células vegetativas y esporos y de *Enterococcus* sp. se caracterizan por una fase de inactivación lineal inicial rápida seguida de una fase de disminución lenta, obteniéndose la formación de una cola o tailing-off.
- ♦ Los modelos matemáticos de Hom modificado, Mafart y bifásico se ajustan adecuadamente a las curvas de inactivación de las tres formas bacterianas.

## Eliminación de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp. mediante radiación solar

### *Sobre las poblaciones de C. perfringens (células vegetativas y esporos)*

- ♦ Los tratamientos de fotocatálisis, irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y fotocatálisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\lambda > 320$  nm) mejoran la capacidad de desinfección alcanzada por el tratamiento de irradiación en solitario, tanto sobre las formas vegetativas (en 5, 7 y 5,8 veces, respectivamente) como sobre las formas esporuladas (6,5, 5,6 y 5 veces, respectivamente).
- ♦ En términos estadísticos, se observan diferencias significativas entre los tratamientos de fotocatálisis, irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y fotocatálisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respecto al tratamiento de irradiación y entre la fotocatálisis y el tratamiento de irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $p < 0,05$ ) sobre las células vegetativas. Respecto a esporos, también se detectan diferencias significativas entre la fotocatálisis, irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y fotocatálisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respecto a la irradiación ( $p > 0,05$ ).
- ♦ Las poblaciones esporuladas de *C. perfringens* presentan una mayor resistencia a los tratamientos de irradiación, fotocatálisis, irradiación/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y fotocatálisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que sus formas vegetativas.
- ♦ La presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como un adicional aceptor de electrones acelera la velocidad fotolítica y fotocatalítica de inactivación de las poblaciones vegetativas de *C. perfringens*, aunque respecto a las poblaciones esporuladas, sólo incrementa el nivel de inactivación del tratamiento de irradiación, ya que en este caso la fotocatálisis es más eficaz que el el tratamiento fotocatálisis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- ♦ No se aprecia un fenómeno de sinergia entre el TiO<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de radiación solar en los ensayos de las células vegetativas y esporos de *C. perfringens*.
- ♦ Las variables más influyentes en la inactivación de las células vegetativas son el tiempo de tratamiento y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Respecto a los esporos, las más influyentes son el tiempo de tratamiento, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el TiO<sub>2</sub>. La interacción más significativa para ambas formas celulares es la combinación [TiO<sub>2</sub>][H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>].

*Sobre las poblaciones de Enterococcus sp.*

- ♦ La presencia de la radiación UVB en los tratamientos de irradiación ( $\lambda > 290$  nm) produce por si sola la completa inactivación de las poblaciones de *Enterococcus* sp, por lo que la adición de  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  o su combinación no mejoran significativamente los resultados de desinfección obtenidos con la irradiación por si sola ( $\lambda > 290$  nm).
- ♦ No existen diferencias significativas entre los tratamientos de irradiación, fotocátalisis, irradiación/ $\text{H}_2\text{O}_2$  y fotocátalisis/ $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $p > 0,05$ ).
- ♦ El tratamiento irradiación/ $\text{H}_2\text{O}_2$  muestra un “efecto residual” sin detectarse un recrecimiento posterior durante 3 horas de oscuridad. El resto de tratamientos no consiguen una desinfección total del agua al final del tratamiento por lo que se observa una recuperación bacteriana en el periodo post-tratamiento.
- ♦ No se aprecia un fenómeno de sinergia entre el  $\text{TiO}_2$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en presencia de radiación solar en los ensayos de *Enterococcus* sp.
- ♦ Las variables más influyentes en la inactivación de *Enterococcus* sp. son la radiación UVB, seguida del tiempo de tratamiento y la interacción más influyente es la [radiación UVB][ $\text{TiO}_2$ ].
- ♦ En ausencia de radiación UVB, los tratamientos fotocátalisis, fotocátalisis/ $\text{H}_2\text{O}_2$  e irradiación/ $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\lambda > 320$  nm) obtienen resultados superiores de inactivación con respecto a la irradiación en solitario (7,6; 6,3 y 1,3 veces más, respectivamente), mostrando diferencias significativas con los dos primeros tratamientos ( $p < 0,05$ ).
- ♦ No se observan diferencias en los resultados de inactivación obtenidos con irradiación intermitente y continua, a excepción del tratamiento de irradiación, donde el efecto bactericida es dos veces superior al incrementar el tiempo de irradiación continua.
- ♦ Las células vegetativas de *C. perfringens* son las formas más sensibles a los tratamientos de irradiación estudiados, pues alcanzan mayores niveles de inactivación en un menor tiempo. A continuación, *Enterococcus* sp. alcanza inactivaciones mayores que los esporos, salvo en el tratamiento de irradiación/ $\text{H}_2\text{O}_2$ .

- ♦ No se pueden obtener conclusiones del comportamiento post-irradiación ya que ninguno de los tratamientos alcanza una desinfección completa de la muestra al final de los ensayos.
- ♦ Las variables más influyentes en la inactivación de *Enterococcus* sp. son el tiempo de tratamiento y el  $\text{TiO}_2$ ; la interacción más importante el  $[\text{tiempo}][\text{TiO}_2]$ .

### **Eliminación de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp. mediante ozono**

- ♦ Los tratamientos de ozonización, peroxona,  $\text{O}_3/\text{TiO}_2$  y  $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$  consiguen inactivar de manera efectiva las poblaciones de células vegetativas de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp.
- ♦ *C. perfringens* es más sensible al tratamiento peroxona que a los tratamientos de ozonización y  $\text{O}_3/\text{TiO}_2$ , mientras que *Enterococcus* sp. se inactiva de manera similar con los tratamientos de peroxona y  $\text{O}_3/\text{TiO}_2$ , y más lentamente con la ozonización y el  $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$ .
- ♦ La presencia de materia orgánica natural en el agua reduce el poder bactericida del ozono ya que compite con las bacterias presentes en la muestra por las especies reactivas desinfectantes generadas durante el proceso, confirmando que la desinfección con ozono depende de la calidad del agua.
- ♦ Las variables más influyentes y las más significativas en la inactivación de las células vegetativas de *C. perfringens* son el tipo de muestra (natural o sintética), la dosis de  $\text{O}_3$  y la presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- ♦ La variable más influyente en la inactivación de *Enterococcus* sp. es la dosis de ozono y la interacción más significativa es la combinación  $[\text{TiO}_2][\text{H}_2\text{O}_2]$ .
- ♦ Las curvas de inactivación de *C. perfringens* y *Enterococcus* sp. no responden a funciones lineales sino que presentan cola y en el caso concreto de los tratamientos de ozonización y  $\text{O}_3/\text{TiO}_2$ , las gráficas de *C. perfringens* son sigmoideas, con hombro y cola.
- ♦ Los modelos matemáticos aplicados son adecuados para describir la inactivación de ambas especies por los tratamientos de ozono estudiados.
- ♦ Los costes asociados a los tratamientos de ozonización se elevan por la incorporación del reactivo  $\text{TiO}_2$  sin derivar en resultado que compensen su

incorporación al proceso. Por el contrario, la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  disminuye los costes que suponen los tratamientos de ozonización, mejorando además los resultados obtenidos.

Capítulo 8.

Bibliografía

---



- AENOR, Asociación Española de Normalización y Certificación. 1997. Calidad del agua. Ed. AENOR. ISBN: 84-8143-074-9.
- Alrousan D.M.A., Dunlop P.S.M., McMurray T.A., Byrne J.A. 2009. Photocatalytic inactivation of *E. coli* in surface water using immobilised nanoparticle TiO<sub>2</sub> films. *Water Research*, 43, 47-54.
- Andreozzi R., Caprio V., Insola A., Martota R. 1999. Advanced oxidation processes for water purification and recovery. *Catalysis Today*, 53, 51-59.
- Araujo M., Sueiro R.A., Gómez M.J., Garrido M.J. 2001. Evaluation of fluorogenic TSC agar for recovering *Clostridium perfringens* in groundwater samples. *Water Science and Technology*, 43 (12), 201-204.
- Araujo M., Sueiro R.A., Gómez M.J., Garrido M.J. 2004. Enumeration of *Clostridium perfringens* spores in groundwater samples: comparison of six culture media. *Journal of Microbiological Methods*, 57, 175-180.
- Azzellino A., Antonelli M., Canziani R., Malpei F., Marinetti M., Nurizzo C. 2011. Multivariate modelling of disinfection kinetics: A comparison among three different disinfectants. *Desalination and Water Treatment*, 29, 128-139.
- Bancroft K.P. 1984. Ozonation and oxidation competition values. *Water Research*, 18, 473.
- Bates A.J. 2000. Water as Consumed and its Impact on the Consumer—Do We Understand the Variables? *Food and Chemical Toxicology*, 38, S29–S36.
- Bellamy W.D., Hickman G.T., Mueller P.A., Ziemba N. 1991. Treatment of VOC-contaminated groundwater by hydrogen peroxide and ozone oxidation. *Research Journal Water Pollution Control Federation*, 63(2), 120-128.
- Benabbou A.K., Derriche Z., Felix C., Lejeune P., Guillard C. 2007. Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli*. Effect of concentration of TiO<sub>2</sub> and microorganism, nature, and intensity of UV irradiation. *Applied Catalysis B: Environmental*, 76, 257–263.
- Bezirtzoglou E., Panagiotou A., Savvaidis I., Maipa V. 1997. Distribution of *Clostridium perfringens* in polluted lake environments. *Anaerobe*, 3, 169-172.
- Blake D.M., Maness P.C., Huang Z., Wolfrum E.J., Huang J. 1999. Application of the photocatalytic chemistry of titanium dioxide to disinfection and killing of cancer cells. *Separation and Purification Methods*, 28(1), 1-50.
- Blanco J., Malato S., Fernández-Ibañez P., Alarcón D., Gernjak W., Maldonado M.I. 2009. Review of feasible solar energy applications to water processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13, 1437–1445.



- Borrego J.J., Córnaux R., Moriñigo M.A., Martínez-Manzanares E., Romero P. 1990. Coliphages as an indicator of faecal pollution in water. Their survival and productive infectivity in natural aquatic environments. *Water Research*, 24 (1), 111-116.
- Bourgeois C.M., Mesle J.F., Zucca J. 1994. Microbiología alimentaria. Vol. I, Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria. Edición Acribia. ISBN: 84-2000-771-4.
- Boyle M., Sichel C., Fernández-Ibañez P., Arias-Quiroz B., Iriarte-Puña M., Mercado A., Ubomba-Jaswa E., McGuigan K.G. 2008. Bactericidal effect of solar water disinfection under real sunlight conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (10), 2997-3001.
- Butterfield I.M., Christensen P.A., Curtis T.P., Gunlazuardi J. 1997. Water disinfection using an immobilised titanium dioxide film in a photochemical reactor with electric field enhancement. *Water Research*, 31 (3), 675-677.
- Byrne J.A., Fernández-Ibañez P., Dunlop P.S.M., Alrousan D.M.A., Hamilton J.W.J. 2011. Photocatalytic enhancement for solar disinfection of water: A review. *International Journal of Photoenergy*, 2011, 1-12.
- Canche A. 2008. Estudio de la aplicación de tecnología de oxidación avanzada basadas en dióxido de titanio, peróxido de hidrógeno y luz ultravioleta como complemento a la cloración en tratamientos de potabilización de aguas naturales. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Casolari A. 1988. Microbial death. *Physiological models in microbiology*. Ed. Boca Raton, 1-44.
- Casteel M.J., Sobsey M.D., Arrowood M.J. 2000. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and other microbes in water and wastewater by electrochemically generated mixed oxidants. *Water Science and Technology*, 41 (7), 127-134.
- Cerf O. 1977. A review: tailing of survival curves of bacterial spores. *Journal of Applied Bacteriology*, 42, 1-19.
- Chang J., Ossoff S., Lobe D., Dorfman M., Dumais C., Qualls R., Johnson D. 1985. UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 49 (6), 1361-1365.
- Chauret C.P., Radziminski C.Z., Lepuil M., Creason R., Andrews R.C. 2001. Chlorine dioxide inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and bacterial spore indicators. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (7), 2993-3001.
- Chick H. 1908. An investigation of the laws of disinfection. *Journal of Hygiene*, 8, 92-158.

- Cho M., Chung H., Yoon J. 2003. Disinfection of water containing natural organic matter by using ozone- initiated radical reactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (4), 2284-2291.
- Cho M., Chung H., Choi W., Yoon J. 2004. Linear correlation between inactivation of *E.coli* and OH radical concentration in TiO<sub>2</sub> photocatalytic disinfection. *Water Research* 38, 1069-1077.
- Cho M., Chung H., Choi W., Yoon J. 2005. Different inactivation behaviors of MS-2 phage and *Escherichia coli* in TiO<sub>2</sub> photocatalytic disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (1), 270-275.
- Cho M. y Yoon J. 2006. Enhanced bactericidal effect of O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> followed by Cl<sub>2</sub>. *Ozone: Science and Engineering*, 28, 335-340.
- Cho M., Kim J., Kim J.Y., Yoon J., Kim J.H. 2010. Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants. *Water Research*, 44, 3410-3418.
- Chong M.N., Jin B., Chow C.W.K., Saint C. 2010. Recent developments in photocatalytic water treatment technology: A review. *Water Res.* 44, 2997-3027.
- Cortés S., Ormad P.; Gracia R., Ovelleiro J.L. 1996. Caracterización de compuestos organoclorados en medio acuoso. *Tecnología del Agua*, 153, 51- 56.
- Cushnie T., Robertson P.K.J., Officer S., Pollard P.M., McCullagh C., Robertson J.M.C. 2009. Variables to be considered when assessing the photocatalytic destruction of bacterial pathogens. *Chemosphere*, 74, 1374-1378.
- Directiva 91/271/CEE del Consejo de la Unión Europea de 21 de mayo de 1991 sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas. DOCE n° L135, de 30/05/91.
- Directiva 98/83/CE de 3 de noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano.
- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de octubre de 2000 por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- Directiva 2006/7/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de febrero de 2006 relativa a la gestión de la calidad de las aguas de baño y por la que se deroga la Directiva 76/160/CEE.
- Directiva 2006/44/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de septiembre de 2006 relativa a la calidad de las aguas continentales que requieren protección o mejora para ser aptas para la vida de los peces.

Directiva 2006/113/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de diciembre de 2006 relativa a la calidad exigida a las aguas para cría de moluscos.

D'Ocon M.C., García M.J., Vicente-García V. 2002. Fundamentos y Técnicas de Análisis Bioquímico: análisis de muestras biológicas. Ed. Paraninfo. Madrid. ISBN: 84-9732-158-8.

Duncan C.L. y Strong D.H. 1968. Improved Medium for Sporulation of *Clostridium perfringens*. Applied Microbiology, 16, 82-89.

Dunlop P.S.M., McMurray T.A., Hamilton J.W.J., Byrne J.A. 2008. Photocatalytic inactivation of *Clostridium perfringens* spores on TiO<sub>2</sub> electrodes. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 196, 113-119.

Eaton A.D., Clesceri L.S., Rice E.W., Greenberg A.E., Franson M.A.H. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21 Edition. APA-AWWA-WEF. ISBN 08-7553-047-8.

Elmolla E.S. y Chaudhuri M. 2009. Degradation of the antibiotics amoxicillin, ampicillin and cloxacillin in aqueous solution by the photo-Fenton process. Journal of Hazardous Materials, 172, 1476-1481.

Elmolla E.S. y Chaudhuri M. 2010. Comparison of different advanced oxidation processes for treatment of antibiotic aqueous solution. Desalination, 256, 43-47.

Environmental Agency. 2010. The Microbiology of Drinking Water (2010) - Part 6 - Methods for the isolation and enumeration of sulphite-reducing clostridia and *Clostridium perfringens* by membrane filtration. Methods for the Examination of Waters and Associated Materials.

Etron Ecology. 2001. El ozono como oxidante y desinfectante. Tecnología del Agua, 216, 56-64.

EPA, Environmental Protection Agency. 1999. Alternative Disinfectants and Oxidants. Guidance Manual. Office of Water. 815-R-99-014.

Fernández P. 2003. Propiedades coloidales de partículas TiO<sub>2</sub>: aplicación al tratamiento fotocatalítico solar de aguas. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Fernández P., Blanco J., Sichel C., Malato S. 2005. Water disinfection by solar photocatalysis using compound parabolic collectors. Catalysis Today, 101, 345-352.

- Fernando W.J.N. y Othman R. 2006. Relevance of diffusion through bacterial spore coats/membranes and the associated concentration boundary layers in the initial lag phase of inactivation: A case study for *Bacillus subtilis* with ozone and monochloramine. *Mathematical Biosciences*, 199, 175-187.
- Finch G.R., Yuen W.C., Uibel B.J. 1992. Inactivation of *Escherichia coli* using ozone and ozone-hydrogen peroxide. *Environmental Technology*, 13, 571-578.
- Galofré B., Israel S., Dellundé J., Ribas F. 2004. Aerobic bacterial spores as process indicators for protozoa cysts in water treatment plants. *Water Science and Technology*, 50 (1), 165-172.
- Gamazo C., López-Goñi I., Díaz R. 2005. Manual práctico de microbiología. Ed. Masson. ISBN 84-4581-519-9.
- Geeraerd A.H., Herremans C.H., Van Impe J.F. 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 59, 185-209.
- Gesche E., Vallejos A., Saez M. 2003. Efficiency of sulphite-reducing bacteria as sanitary-indicator for water. MPN-Method. *Archivos de Medicina Veterinaria*, XXXV (1), 99-107.
- Glaze W.H., Kang J.W., Chapin D.H. 1987. The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation. *Ozone Science and Engineering*, 9 (4), 335-352.
- Gogniat G., Thyssen M., Denis M., Pulgarin C., Dukan S. 2006. The bactericidal effect on TiO<sub>2</sub> photocatalysis involves adsorption onto catalyst and the loss of membrane integrity. *FEMS Microbiology Letters*, 258, 18-24.
- Gomes A.I., Santos J.C., Vilar V.J.P., Boaventura R.A.R. 2009. Inactivation of bacteria *E.coli* and photodegradation of humic acids using natural sunlight. *Applied Catalysis B: Environmental*, 88, 283-291.
- Gómez N. Modelización de la inactivación microbiana por pulsos eléctricos de alto voltaje. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Gracia R., Cortés S., Sarasa J., Ormad P., Ovelleiro J.L. 1999. Tratamientos oxidativos en la potabilización del agua. La ozonización catalítica como técnica complementaria a la cloración. *Tecnología del Agua*, 188, 34-44.
- Guimarães J.R. y Barretto A.S. 2003. Photocatalytic inactivation of *Clostridium perfringens* and coliphages in water. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 20 (4), 403-411.

- Guittonneau S., Delaat J., Dore M., Duguet J.P., Bonnel C. 1988. Comparative-study of the photodegradation of aromatic-compounds in water by UV and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV. Environmental Technology Letters, 9 (10), 1115-1128.
- Gumy D., Rincón A.G., Hajdu R., Pulgarin C. 2006. Solar photocatalysis for detoxification and disinfection of water: Different types of suspended and fixed TiO<sub>2</sub> catalysts study. Solar Energy, 80, 1376-1381.
- Guzel-Seydim Z.B., Greene A.K., Seydim A.C. 2004. Use of ozone in the food industry. Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie, 37, 453-460.
- Gyürek L.L. y Finch G.R. 1998. Modeling water treatment chemical disinfection kinetics. Journal of Environmental Engineering, 124 (9), 783-793.
- Hartmann P.S. y Eisenstark A. 1978. Synergistic killing of *Escherichia coli* by near-UV radiations and hydrogen peroxide: distinction between RecARepairable and RecA-Nonrepairable damage. Journal of Bacteriology, 133, 769-774.
- Haas C.N. y Joffe J. 1994. Disinfection under dynamic conditions: modification of Hom's model for decay. Environmental Science and Technology, 28, 1367-1369.
- Health Canada. 2006. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Guideline Technical. Document — Bacterial Waterborne Pathogens — Current and Emerging Organisms of Concern. Water Quality and Health Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch, Health Canada, Ottawa, Ontario.
- Hijnen W.A., Willemsen-Zwaagstra J., Hiemstra P., Medema G.J., Van der Kooij D. 2000a. Removal of sulphite-reducing clostridia spores by full-scale water treatment processes as a surrogate for protozoan (oo)cysts removal. Water Science and Technology, 41 (7), 165-171
- Hijnen W.A.M., Van Veenendaal D.A., Van der Speld W.M.H., Visser A., Hoogenboezem W., Van der Kooij D. 2000b. Enumeration of faecal indicator bacteria in large water volumes using on site membrane filtration to assess water treatment efficiency. Water Research, 34, 1659-1665.
- Hijnen W.A.M., Schijven J.F., Bonné P., Visser A., Medema G.J. 2004. Elimination of viruses, bacteria and protozoan oocysts by slow sand filtration. Water Science and Technology, 50 (1), 147-154.
- Hirata T., Kawamura K., Sonoki S., Hirata K., Kaneko M., Taguchi K. 1991. *Clostridium perfringens*, as an indicator microorganism for the evaluation of the effect of wastewater and sludge treatment systems. Water Science and Technology, 24 (2), 367-372.

- Hoerter J.D., Arnold A.A., Kuczynska D.A., Shibuya A., Ward C.S., Sauer M.G., Gizachew A., Hotchkiss T.M., Fleming T.J., Johnson S. 2005. Effects of sublethal UVA irradiation on activity levels of oxidative defense enzymes and protein oxidation in *Escherichia coli*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 81, 171–180.
- Hoigné J. 1998. Chemistry of aqueous ozone, and transformation of pollutants by ozonation and advanced oxidation processes. En: *The handbook of environmental chemistry quality and treatment of drinking water*. Edición Springer.
- Hoigné J. y Bader H. 1975. Ozonation of water: role of hydroxyl radicals as oxidizing intermediates. *Science*, 190, 782-784.
- Hoigné J. y Bader H. 1977. The role of hydroxyl radical reactions in ozonation processes in aqueous solutions. *Water Research*, 10, 377-386.
- Hoigné J. y Bader H. 1978. Ozone initiated oxidations of solutes in wastewater: a reaction kinetic approach. *Progress in Water Technology*, 10, 657-671.
- Hoigné J. y Bader H. 1983. Rate constant of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water-II. Dissociating organic compounds. *Water Research*, 17, 185-194.
- Hom L.W. 1972. Kinetics of chlorine disinfection in an ecosystem. *Journal of Sanitary Engineering Division*, 98 (1), 183-193.
- Huang Z., Maness P.C., Blake D.M., Wolfrum E.J., Smolinski S.L., Jacoby W.A. 2000. Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 130, 163–170.
- Hunt N.K. y Mariñas B.J. 1999. Inactivation of *Escherichia coli* with ozone: chemical and inactivation kinetics. *Water Research*, 33 (11), 2633-2641.
- Ibañez J.A., Litter M.I., Pizarro R.A. 2003. Photocatalytic bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> on *Enterobacter cloacae*. Comparative study with other Gram (-) bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 157, 81-85.
- Ibarz C. 2008. Desactivación de enterococos en agua natural mediante fotocátalisis con dióxido de titanio y radiación solar. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Ireland J.C., Klostermann P., Rice E.W., Clark R.M. 1993. Inactivation of *Escherichia coli* by titanium dioxide photocatalytic oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (5), 1668-1670.
- Jay J.M., Loessner M.J., Golden D.A. 2005. *Microbiología moderna de los alimentos*. Ed. Acribia S.A. 5ª Ed. ISBN: 978-84-2001-125-7.

- Kolthoff I.M. y Belcher R. 1957. Volumetric Analysis III. Ed. New York: Interscience.
- Kositzi M., Poullos I., Malato S., Caceres J., Campos A. 2004. Solar photocatalytic treatment of synthetic municipal wastewater. *Water Research*, 38, 1147–1154.
- Labatiuk C.W., Belosevic M., Finch G.R. 1994. Inactivation of *Giardia muris* using ozone and ozone-hydrogen peroxide. *Ozone: Science and Engineering*, 16 (1), 67–78.
- Lamotte, M. 1981. Estadística biológica. Principios Fundamentales. Ed. Toray-Masson. ISBN 84-3110-107-5.
- Lanao M., Ormad M.P., Ibarz C., Miguel N., Ovelleiro J.L. 2008. Bactericidal Effectiveness of O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> on *Clostridium perfringens*. *Ozone Science and Technology*, 30(6), 431-438.
- Lanao M., Ormad M.P., Goñi P., Miguel N., Mosteo R., Ovelleiro J.L. 2010. Inactivation of *Clostridium perfringens* spores and vegetative cells by photolysis and TiO<sub>2</sub> photocatalysis with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Solar Energy* 84, 703-709.
- Lanao M., Ormad M.P., Mosteo R., Ovelleiro J.L.. 2012. Inactivation of *Enterococcus* sp. by photolysis and TiO<sub>2</sub> photocatalysis with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in natural water. *Solar Energy*, 86, 619-625.
- Lee Y. y Nam S. 2002. Reflection on kinetic models to the chlorine disinfection for drinking water production. *The Journal of Microbiology*, 40 (2), 119-124.
- Legrini O., Oliveros E., Braun A.M. 1993. Photochemical processes for water treatment. *Chemical Reviews*, 93, 671–698.
- Ley 14/1986 General de Sanidad de 25 de abril. BOE 102.
- Li L. 2004. Effects of initial microbial density on disinfection efficiency in a continuous flow system and validation of disinfection batch kinetics in a continuous flow system. Tesis Doctoral. Universidad de Drexel.
- Ljubas D. 2005. Solar photocatalysis— a possible step in drinking water treatment. *Energy*, 30, 1699–1710.
- Logemann F.P. y Annee J.H.J. 1997. Water treatment with a fixed bed catalytic ozonation process. *Water Science and Technology*, 35(4) 353-360.
- Lonnen J., Kilvington S., Kehoe S.C., Al-Touati F., McGuigan K.G. 2005. Solar and photocatalytic disinfection of protozoan, fungal and bacterial microbes in drinking water. *Water Research*, 39, 877-883.

- Lucas M.S., Peres J.A., Puma G.L. 2010. Treatment of winery wastewater by ozone-based advanced oxidation processes ( $O_3$ ,  $O_3/UV$  and  $O_3/UV/H_2O_2$ ) in a pilot-scale bubble column reactor and process economics. *Separation and Purification Technology*, 72, 235–241.
- Madigan M.T., Martinko J. M., Parker J. 2003. *Brock Biología de los Microorganismos*. Ed. Pearson Educación S.A, 10ª Ed. ISBN: 84-205-3679-2.
- Mafart P., Couvert O., Gaillard S., Leguerinel I. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 107-113.
- McLoughlin O.A., Ibañez P.F., Gernjak W., Rodriguez S.M., Gill L.W. 2004. Photocatalytic disinfection of water using low cost compound parabolic collectors. *Solar Energy*, 77 (5), 625-633.
- Malato S., Caceres J., Aguera A., Mezcua M., Hernando D., Vial J., Fernández-Alba A.R. 2001. Degradation of imidacloprid in water by photo-fenton and  $TiO_2$  photocatalysis at a solar pilot plant: A comparative study. *Environmental Science and Technology*, 35, 4359-4366.
- Malato S., Fernández-Ibañez P., Maldonado M.I., Blanco J., Gernjak W. 2009. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catalysis Today*, 147, 1-59.
- Maldonado M.I., 2000. Descontaminación de aguas de lavado de envases de plaguicidas mediante fotocatalisis solar. Tesis Doctoral. Universidad de Almería.
- Mahltig B., Gutmann E., Meyer D.C. 2011. Solvothermal preparation of nanocrystalline anatase containing  $TiO_2$  and  $TiO_2/SiO_2$  coating agents for application of photocatalytic treatments. *Materials Chemistry and Physics*, 127, 285-291.
- Mamane H., Shemer H., Linden K.G. 2007. Inactivation of *E.coli*, *B. subtilis* spores and MS2, T4 and T7 phage using  $UV/H_2O_2$  advanced oxidation. *Journal of Hazardous Materials*, 146, 479-486.
- Maness P., Smolinski S., Blake D.M., Zheng H., Wolfrum E., Jacoby W.A. 1999. Bactericidal activity of photocatalytic  $TiO_2$  reaction: toward an understanding of its killing mechanism. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 4094-4098.
- MARM, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. 2010. Guía para la aplicación del RD160/2007 por el que se establece el Régimen Jurídico de la Reutilización de las Aguas Residuales. Centro de Publicaciones.
- Matsunaga T., Tomodam T., Nakajima T., Wake H. 1985. Photochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders. *FEMS Microbiology Letters*, 29, 211-214.



- McGuigan K.G., Joyce T.M., Conroy R.M., Gillespie J.B., Elmore-Meegan M. 1998. Solar disinfection of drinking water contained in transparent plastic bottles: characterizing the bacterial inactivation process. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 1138-1148.
- Medema G.J., Bahar M., Schets F.M. 1997. Survival of *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli*, Faecal Enterococci and *Clostridium perfringens* in river water: influence of temperature and autochthonous microorganisms. *Water Science and Technology*, 35 (11-12), 249-252.
- Méndez J. M., Gonzalez C., Alvarado-Lassman A., Alvarado-Kinnell G., Martinez-Delgadillo S. 2008. Fecal bacteria survival in ammonia-treated wastewater dewatered sludges. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 7 (3), 229-235.
- Miguel N. 2010. Estudio de la eliminación de plaguicidas presentes habitualmente en aguas de la cuenca del Ebro mediante procesos de oxidación avanzada. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Mills A., Davies R.H., Worsley D. 1993. Water-purification by semiconductor photocatalysis. *Chemical Society Reviews*, 22 (6), 417-425.
- Moriñigo M.A, Córnaux R., Muñoz M.A., Romero P., Borrego J.J. 1990. Relationships between *Salmonella* spp. and indicator microorganisms in polluted natural waters. *Water Research*, 24(1), 117-120.
- Mosteo R., Miguel N., Martín-Muniesa S., Ormad M.P., Ovelheiro J. L. 2009. Evaluation of trihalomethane formation potential in function of oxidation processes used during the drinking water production process. *Hazardous Materials*, 172, 661-666.
- Murillo R., Sarasa J., Lanao M., Ovelheiro J.L. 2010. Degradation of chlorpyrifos in water by advanced oxidation processes. *Water Science and Technology: Water Supply-WSTWS*, 10 (1), 1-6.
- Norma Española UNE-EN 26461-2: "Calidad del agua. Detección y recuento de los esporos de microorganismos anaerobios sulfito-reductores (clostridia). Parte 2: Método de filtración por membrana."
- Norma UNE-EN ISO 7899-2:2001: "Calidad del agua. Detección y recuento de enterococos intestinales. Parte 2: método de filtración de membrana".
- OMS, Organización Mundial de la Salud. 1995. Guías para la calidad del agua potable. Vol. 1. Recomendaciones. ISBN 92-4354-460-8.
- OMS, Organización Mundial de la Salud. 2011. Guidelines for drinking-water quality - 4th ed. 1. Potable water-standards. 2. Water-standards. 3. Water quality-standards. 4.Guidelines. ISBN 978-92-4154-815-1.

- Oppenländer T. 2003. Photochemical Purification of Water and Air. Edición Wiley-VCH, Germany. ISBN 35-2730-563-7.
- Orden de 11 Mayo de 1988 sobre características básicas de calidad que deben ser mantenidas en las corrientes de aguas superficiales cuando sean destinadas a la producción de agua potable. BOE 124 de 24 de mayo de 1988.
- Ormad M.P. 1996. Vertidos de la fabricación de plaguicidas derivados del DDT y triclorobenceno. Caracterización, control y oxidación con ozono. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Ormad M.P., Claver A., Miguel N., Ovelleiro J.L. 2007. Eliminación de plaguicidas mediante procesos utilizados en España para la producción de agua potable. Tecnología del Agua, 290, 26-40.
- Ormad M.P., Lanao M., Goñi P., Ibarz C., Ovelleiro J.L. 2008a. Eliminación de *Clostridium perfringens* en diversas etapas de una estación de tratamiento de aguas potables. Tecnología del Agua, 302, 30-34.
- Ormad, M.P., Miguel N., Claver A., Matesanz J.M., Ovelleiro, J.L. 2008b. Pesticides removal in the process of drinking water production. Chemosphere, 71, 97-106.
- Ormad M.P., García Castillo F.J., Munárriz Cid B. 2009. Eliminación de plaguicidas en aguas de abastecimiento mediante cloración, ozonización y adsorción con GAC. Tecnología del Agua, 314, 24-29.
- Ormad M.P., Miguel N., Lanao M., Mosteo R., Ovelleiro J.L. 2010. Effect of application of ozone and ozone combined with hydrogen peroxide and titanium dioxide in the pesticides removal from water. Ozone Science and Engineering, 32, 25-32.
- Ormad M.P. y Calvo B. 2010. Gestión y Tratamiento de Aguas Residuales. Ed. Stylo Digital. ISBN: 978-84-9386-680-8.
- Paillard H., Doré M., Bourbigot M.M. 1991. Prospects concerning applications of catalytic ozonation in drinking water treatment. 10<sup>th</sup> Ozone World Congress Proceeding. Mónaco, 313-329.
- Payment P., Trudel M., Plante R. 1985. Elimination of viruses and indicator bacteria at each step of treatment during preparation of drinking water at seven water treatment plants. Applied and Environmental Microbiology, 49 (6), 1418-1428.
- Payment P. y Franco E. 1993. *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. Applied and Environmental Microbiology, 59 (8), 2418-2424.

- Payment P. 1999. Poor efficacy of residual chlorine disinfectant in drinking water to inactivate waterborne pathogens in distribution systems. *Canadian Journal of Microbiology*, 45, 709-715.
- Peleg M. y Cole M.B. 1998. Reinterpretation of microbiol survival curves. *Critical Reviews in Food Science*, 3, 353-380.
- Pérez J.A. y Espigares M. 1999. Estudio Sanitario del Agua. Universidad de Granada. España. ISBN 84-3382-529-1.
- Pernitsky D.J., Finch G.R., Huck P.M. 1995. Disinfection kinetics of heterotrophic plate-count bacteria in biologically treated potable water. *Water Research*, 29 (5), 1235-1241.
- Peyton G.R. y Glaze W.H. 1988. Destruction of pollutants in water with ozone in combination with ultraviolet radiation. *Photolysis of aqueous ozone. Environmental Science and Technology*, 22, 761-767.
- Pham H.N., Mcdowell T., Wikins E. 1995. Photocatalytically-mediated disinfection of water using TiO<sub>2</sub> as a catalyst and spore-forming *Bacillus pumilus* as a model. *Journal of Environmental Science and Health. Part A-Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 30 (3), 627-636.
- Pruitt K.M. y Kamau D.N. 1993. Mathematical models of bacteria growth, inhibition and death under combined stress conditions. *Journal of Industrial Microbiology*, 12, 221-231.
- RD 140/2003 de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. BOE 54 de 21 de febrero de 2003.
- RD 1620/2007 de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. BOE 294 de 8 de diciembre de 2007.
- Regalado E. 2008. Eliminación de enterococos en aguas naturales mediante técnicas de oxidación avanzada basadas en ozono, peróxido de hidrógeno y dióxido de titanio. Proyecto Fin de Carrera de Ingeniería Química. Universidad de Zaragoza.
- Riesenman P.J. y Nicholson W.L. 2000. Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 620-626.
- Rincón A.G., Pulgarin C., Adler N., Peringer P. 2001. Interaction between *E. coli* inactivation and DBP-precursors-dihydroxybenzene isomers- in the photocatalytic process of drinking water disinfection with TiO<sub>2</sub>. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 139, 233-241.

- Rincón A.G. y Pulgarin C. 2003. Photocatalytical inactivation of *E. coli*: effect of (continuous–intermittent) light intensity and of (suspended–fixed) TiO<sub>2</sub> concentration. *Applied Catalysis B: Environmental*, 44, 263-284.
- Rincón A.G. y Pulgarin C. 2004a. Field solar *E. coli* inactivation in the absence and presence of TiO<sub>2</sub>: is UV solar dose an appropriate parameter for standarization of water solar disinfection? *Solar Energy*, 77, 635-648.
- Rincón A.G. y Pulgarin C. 2004b. Bactericidal action of illuminated TiO<sub>2</sub> on pure *Escherichia coli* and natural bacterial consortia: post-irradiation events in the dark and assessment of the effective disinfection time. *Applied Catalysis B: Environmental*, 49, 99–112.
- Rincón A.G. y Pulgarin C. 2004c. Effect of pH, inorganic ions, organic matter and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on *E. coli* K12 photocatalytic inactivation by TiO<sub>2</sub>. Implications in solar water disinfection. *Applied Catalysis B: Environmental*, 51 (4), 283-302.
- Rincón A.G. y Pulgarin C. 2006. Comparative evaluation of Fe<sup>+3</sup> and TiO<sub>2</sub> photoassisted processes in solar photocatalytic disinfection of water. *Applied Catalysis B: Environmental*, 63, 222-231.
- Rincón A.G. y Pulgarin C. 2007. Solar photolytic and photocatalytic disinfection of water at laboratory and field scale. Effect of the chemical composition of water and study of the postirradiation events. *Journal of Solar Energy Engineering*, 129, 100-110.
- Rizzo L. 2009. Inactivation and injury of total coliform bacteria after primary disinfection of drinking water by TiO<sub>2</sub> photocatalysis. *Journal of Hazardous Materials*, 165, 48–51.
- Robertson J.M.C., Robertson P.K.J., Lawton L.A. 2005. A comparison of the effectiveness of TiO<sub>2</sub> photocatalysis and UVA photolysis for the destruction of three pathogenic microorganisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 175, 51-56.
- Rook J.J. 1974. Formation of haloforms during chlorination of natural water, *Journal of Water Treatment and Examination*, 23 (2), 234–243.
- Rju J. y Choi W. 2008. Substrate-specific photocatalytic activities of TiO<sub>2</sub> and multiactivity test for water treatment application. *Environmental Science and Technology*, 42, 294-300.
- Smith T. 1895. Notes on *Bacillus coli commune* and related forms, together with some suggestions concerning the bacteriological examination of drinking water. *The American Journal of the Medical Science*, 110, 283-302.

- Snyder S.A., Wert E.C., Rexing D.J., Zegers R.E., Drury D.D. 2006. Ozone oxidation of endocrine disruptors and pharmaceuticals in surface water and wastewater. *Ozone-Science and Engineering*, 28 (6), 445-460.
- Sobsey M.D., Handzel T., Venczel L. 2003. Chlorination and safe storage of household drinking water in developing countries to reduce waterborne disease. *Water Science and Technology*, 47(3), 221-228.
- Sommer R., Pribil W., Pfleger S., Haider T., Werderitsch M., Gehringer P. 2004. Microbicidal efficacy of an advanced oxidation process using ozone/hydrogen peroxide in water treatment. *Water Science and Technology*, 50(1), 159-164.
- Spellman F.R. y Drinan J. 2000. *Manual del Agua Potable*. Ed. Acribia. Zaragoza. ISBN: 84-2001-033-2.
- Staehelin J. y Hoigné, J. 1982. Decomposition of ozone in water: rate of initiation by hydroxide ions and hydrogen peroxide. *Environmental Science and Technology*, 16 (10), 676-681.
- Tomiyasu H., Fukutomi H., Gordon G. 1985. Kinetics and mechanism of ozone decomposition in basic aqueous solution. *Inorganic Chemistry*, 24, 2962-2966.
- Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. 2007. *Introducción a la microbiología*. Ed. Médica Paramericana, 9º Ed. ISBN: 978-95-0060-740-7.
- USEPA, United States Environmental Protection Agency. 2004. *Guidelines for Water Reuse*. EPA/625/R-04/108.
- Venczel L.V., Arrowood M., Hurd M., Sobsey M.D. 1997. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Clostridium perfringens* spores by a mixed-oxidant disinfectant and by free chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (4), 1598-1601.
- Venczel L.V., Likirdopulos C.A., Robinson C.E., Sobsey M.D. 2004. Inactivation of enteric microbes in water by electro-chemical oxidant from brine (NaCl) and free chlorine. *Water Science and Technology*, 50 (1), 141-146.
- Von Gunten V. 2003. Ozonation of drinking water: Part II. Disinfection and byproduct formation in presence of bromide, iodide or chlorine. *Water Research*, 37, 1469–1487.
- Watson H.E. 1908. A note on the variation of the rate of disinfection with change in the concentration of the disinfectant. *Journal of Hygiene*, 8, 536-542.

- Wist J., Sanabria J., Dierolf C., Torres W., Pulgarin C. 2002. Evaluation of photocatalytic disinfection of crude water for drinking-water production. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 147, 241-246.
- Wolfe R.L., Stewart M.H., Liang S., McGuire M.J. 1989. Disinfection of model indicator organisms in a drinking water pilot plant by using peroxona. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(9), 2230-2241.
- Yuranova T., Enea O., Mielczarski E., Mielczarski J., Albers P., Kiwi J. 2004. Fenton immobilized photo-assisted catalysis through a Fe/C structured fabric. *Applied Catalysis B: Environmental* 49, 39-50.

### *Páginas web*

[www.chebro.es](http://www.chebro.es)



ANEXO

Publicaciones científicas

---





## ARTÍCULOS TÉCNICOS

## Resumen

Se evalúa la efectividad de las distintas etapas que constituyen los tratamientos habituales utilizados en las estaciones de tratamiento de aguas potables en España, para la eliminación de un indicador microbiológico de contaminación fecal, *Clostridium perfringens*. Las etapas estudiadas son preoxidación con cloro y ozono, precipitación química, adsorción con carbón activo y filtración en arena. La preoxidación, ya sea con hipoclorito sódico o con ozono, consigue recuentos finales por debajo del límite de detección en las condiciones estudiadas (>8 log). En el resto, la eliminación es mínima, alcanzándose en el mejor de los casos un descenso de 1,32 unidades logarítmicas.

## Palabras clave:

Agua potable, *Clostridium perfringens*, calidad del agua, ozono, cloro, desinfección, indicador fecal.

## Abstract

*Clostridium perfringens* removal in different stages in a Drinking Water Treatment Plant

The purpose of this research is to evaluate the effectiveness of different stages, which take part in the conventional treatments used in the drinking water treatment plants in Spain, in the removal of a microbiological indicator of faecal pollution, *Clostridium perfringens*. The stages studied are preoxidation with chlorine and ozone, chemical precipitation, adsorption with activated coal and filtration in sand. The preoxidation, either with sodium hypochlorite or with ozone, gets final recounts below the detection limit with the conditions studied (> 8log). In the rest of stages, the removal is minimal, achieving 1.32 logarithmic units at best case.

## Keywords:

Drinking water, *Clostridium perfringens*, water quality, ozone, chlorine, disinfection, faecal indicator.

## Eliminación de *Clostridium perfringens* en diversas etapas de una estación de tratamiento de aguas potables

Por: María P. Ormad (\*); Munia Lanao (\*); Pilar Goñi (\*\*); Cristina Ibarz (\*); José Luis Ovelleiro (\*)

(\*) Universidad de Zaragoza

Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente  
C/Pedro Cerbuna, 12  
50009 Zaragoza.  
Tel.: 976 761 156  
Fax: 976 762 142  
E-mail: mpormad@unizar.es

(\*\*) Universidad de Zaragoza

Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública  
C/Domingo Miral, s/n.  
50009. Zaragoza  
Tel.: 976 762 421

### 1. Introducción

Las aguas naturales son la fuente de abastecimiento de las poblaciones, se utilizan en la gran mayoría de actividades industriales y es un recurso imprescindible para la actividad agropecuaria. Sin embargo, la composición natural de las aguas se ve alterada por los productos de deshecho generados por el hombre.

Debido a la gran variedad de microorganismos patógenos que pueden encontrarse en el agua, a su pequeña concentración (en algunos casos por efecto de la dilución), así como la complejidad en el análisis, se hace inviable el control sistemático de todos aquellos microorganismos con importancia sanitaria. Por ello, el control microbiológico del agua se basa en la determinación de microorganismos asociados

que comparten los mismos hábitat, pero cuyo aislamiento y cultivo es sencillo. Estos microorganismos son conocidos como indicadores de contaminación fecal (Borrego *et al.*, 1990). Los indicadores tienen que ser fáciles de aislar y cultivar en el laboratorio, ser relativamente inocuos para el hombre y los animales, estar presentes en sus heces, no multiplicarse en aguas naturales, persistir en el agua de manera similar a los patógenos fecales y dar lugar a un grado de eliminación durante el tratamiento del agua similar al de los patógenos. De hecho, no existe ningún microorganismo que reúna todos los criterios de un indicador ideal.

La Directiva Europea 98/83/CE relativa a la calidad del agua de consumo humano, transpuesta a la legislación española como RD 140/2003,

## ARTÍCULOS TÉCNICOS

obliga a un análisis sistemático de bacterias indicadoras de contaminación fecal en este tipo de agua, en concreto, de *Escherichia coli*, Enterococos y *Clostridium perfringens*. El valor paramétrico para cada uno de ellos es 0 UFC(Unidades Formadoras de Colonias) /100ml. Entre ellos destaca *C. perfringens* porque ante situaciones adversas forma esporas que le permiten sobrevivir en el agua mucho más tiempo que los coliformes y *E. coli*, por lo que se considera un buen indicador biológico y su ausencia es garantía de calidad (Payment and Franco, 1.993).

Hoy día es inviable una aplicación directa de las aguas sin corregir previamente uno o varios parámetros de las mismas. En el caso de que su destino sea el consumo humano, deberá ser sometida a un proceso denominado potabilización en las Estaciones de Tratamiento de Aguas Potables, ETAP.

El presente trabajo tiene como finalidad investigar el poder desinfectante de cada una de las etapas que se utilizan en un tratamiento de potabilización intensivo sobre *C. perfringens*. Las operaciones estudiadas son:

- Preoxidación con cloro
- Preoxidación con ozono
- Adsorción sobre carbón activado en polvo

Tabla 1		
Parámetros	Muestra natural	Muestra fortificada
pH - temperatura	8.12 - 18.2 °C	8.12 - 18.2 °C
Turbidez	88 NTU	88 NTU
Conductividad	887 µs/cm	887 µs/cm
Población de <i>C. perfringens</i>	4 · 10 <sup>2</sup> UFC/100 ml	10 <sup>4</sup> · 10 <sup>8</sup> UFC/100 ml
Carbono orgánico total	3 mg/L	3 mg/L
Demanda de cloro	4 mg/L	4 mg/L

Tabla 1. Caracterización de la muestra natural y de la muestra fortificada.

- Precipitación química con sulfato de aluminio
- Filtración en arena

## 2. Procedimiento experimental

### 2.1. Muestra

Las muestras objeto de estudio proceden de las aguas superficiales del Canal Imperial de Aragón, fuente de abastecimiento de la ciudad de Zaragoza. La toma de muestras se llevó a cabo en el punto de captación del agua de la potabilizadora de Casablanca (Zaragoza) mediante frascos recolectores estériles. Las muestras se conservan a -20°C hasta su utilización. La concentración de *C. perfringens* presente en la muestra natural, 4·10<sup>2</sup>

UFC/100 ml, se consideró bastante baja como para observar el efecto que producen los diferentes tratamientos sobre su reducción. Por ello, se procedió a realizar una fortificación bacteriana de la misma mediante adición externa.

Para llevar a cabo esta fortificación, se prepara una suspensión bacteriana concentrada a partir de una cepa de *C. perfringens* de origen clínico. Esta cepa fue sembrada en agar Schaedler (Scharlau) enriquecido con sangre. Después de 24 horas de incubación a 37°C, las bacterias son cuidadosamente transferidas a una solución salina al 0.9%. Esta suspensión bacteriana se adiciona a la muestra de agua natural constituyendo la muestra fortificada. La Tabla 1 muestra los resultados de

Tabla 2					
Parámetro	Instrumento	Marca	Modelo	Error	Método Normalizado
pH y Temperatura	pH - metro	Crison	GLP 21	≤ 0,02 pH ≤ 0,3 °C	4500 - HB Standard Methods
Conductividad	Conductímetro	Crison	Basic 30	≤ 0,5 °C	Norma UNE - EN 27.888:1.994
Turbidimetría	Turbidímetro	Hanna	LP 2.000	0,2 NTU	ISO 7027 International Standards
Cloro residual	Clorímetro	Hanna	HI 95.711	≤ 0,02mg/l	4.500 - CI G Standard Methods
Carbono Orgánico Total (TOC)	Analizador del TOC	Shimadzu	TOC- Vcsh	5 - 10 %	5.310 B Standard Methods
Demanda de Cloro	Volumetría				5.710 B Standard Methods

Tabla 2. Análisis de parámetros fisicoquímicos de las muestras.



## ARTÍCULOS TÉCNICOS

caracterización de la muestra natural y de la muestra fortificada.

## 2.2. Análisis microbiológicos y fisicoquímicos

Para realizar el análisis de *C. perfringens* se desarrolla el procedimiento descrito en la norma española UNE-EN 26461-2 basado en el método de filtración por membrana. Después de filtrar un determinado volumen de muestra (0.22 µm Millipore), las placas son incubadas en condiciones de anaerobiosis, a 46°C durante 24 horas en agar selectivo SPS. Posteriormente se confirma la identificación mediante la observación de las características morfológicas de la bacteria tras una tinción de gram.

El recuento de colonias se expresa como UFC/100 ml de muestra en cada tiempo de muestreo. Estas concentraciones se transforman a log10 y la inactivación bacteriana, Log (N/N<sub>0</sub>), se calcula a partir de la población inicial (N<sub>0</sub>) y la población superviviente en cada tiempo de muestreo (N<sub>t</sub>).

Todo el material de vidrio en contacto con la muestra se esteriliza en autoclave a 121°C, 15 minutos y todas las soluciones y medios de cultivo utilizados son preparados con reactivos químicos de calidad analítica.

La **Tabla 2** muestra la relación de parámetros fisicoquímicos utilizados en la caracterización de las

muestras, así como la metodología analítica e instrumentación relacionada.

## 2.3. Tratamientos aplicados

Se aplicaron distintos tratamientos utilizados en plantas de tratamiento de aguas potables españolas para estudiar el comportamiento de la bacteria *C. perfringens* frente a ellos. La descripción de estas etapas se detalla a continuación:

- Preoxidación con cloro: Se realiza con hipoclorito sódico (NaClO, 5%, Panreac) utilizando la dosis correspondiente a la demanda de cloro de la muestra. Para llevar a cabo un estudio cinético, se tomaron muestras periódicamente a lo largo de los 10 minutos de tratamiento. El cloro residual se neutralizó con tiosulfato sódico.
- Preoxidación con ozono: El ozono utilizado en el tratamiento fue generado "in situ" en el laboratorio mediante un ozonizador Fisher 500. La instalación se esquematiza en la **Figura 1**. El ozonizador genera una dosis de O<sub>3</sub> de 1.423 mgO<sub>3</sub>/h, que se hace pasa a través de 1,5 l de muestra durante 10 minutos. La muestra se localiza en el interior de un reactor cerrado de vidrio que funciona en régimen semi-continuo, continuo respecto al gas y discontinuo respecto al líquido. El ozono gas se transfiere a la muestra por la parte superior

del reactor a través de un difusor poroso (O<sub>3</sub> introducido).

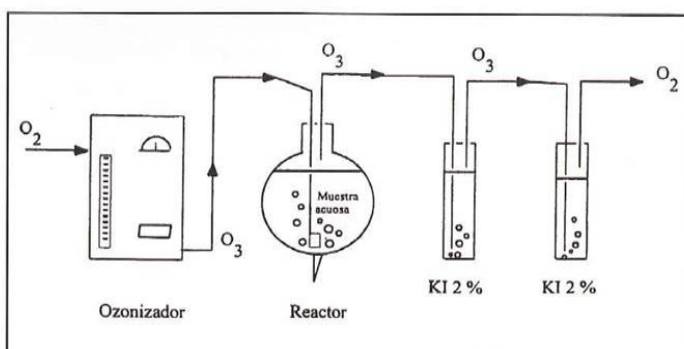
El ozono en exceso (O<sub>3</sub> no consumido) se destruye en el interior de dos borboteadores colocados en serie que contienen una disolución de yoduro potásico al 2%. El O<sub>3</sub> se reduce a O<sub>2</sub>, liberándose a la atmósfera. Así mismo, el O<sub>3</sub> residual disuelto se mide mediante un test colorimétrico (Merck). En consecuencia, el O<sub>3</sub> consumido por la muestra se calcula de la siguiente manera:

$$O_3 \text{ consumido} = O_3 \text{ introducido} - (O_3 \text{ no consumido} + O_3 \text{ residual disuelto}).$$

Para realizar un estudio cinético se toman muestras periódicas a lo largo del tratamiento. El ozono residual se neutralizó con tiosulfato sódico.

- Precipitación química (coagulación-floculación-decantación): Estos ensayos se realizan en un Jar Test a una velocidad de 200 r.p.m. durante 3 minutos para favorecer la coagulación y a 40 r.p.m., 15 minutos para favorecer la floculación. El coagulante utilizado fue sulfato de aluminio (Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>·18H<sub>2</sub>O, Probus) a una concentración 25 mg Al/l (dosis optimizada). Tras la floculación, la muestra se dejó reposar mínimo dos horas en un cono Imhoff, produciéndose el fenómeno de decantación y con ello, la clarificación del agua.

- Adsorción con carbón activo: Se utiliza carbón activo en polvo en una cantidad de 10 mg/l. Se agita a 100 r.p.m. durante 10 minutos. El objetivo es estudiar la capacidad de adhesión de los microorganismos a los granos de carbón para ver el grado de eliminación bacteriana en esta etapa.
- Filtración en arena: En esta etapa se hizo pasar la muestra objeto de estudio por una columna de arena de 100 cm de altura.



**Figura 1.** Descripción de la instalación de ozonización.

## ARTÍCULOS TÉCNICOS

### 3. Resultados e interpretación

Los resultados obtenidos tras la realización de los experimentos se muestran en la **Tabla 3**. La población inicial de *C. perfringens* en cada experimento es diferente debido a la dificultad inherente que conlleva la preparación de la suspensión bacteriana.

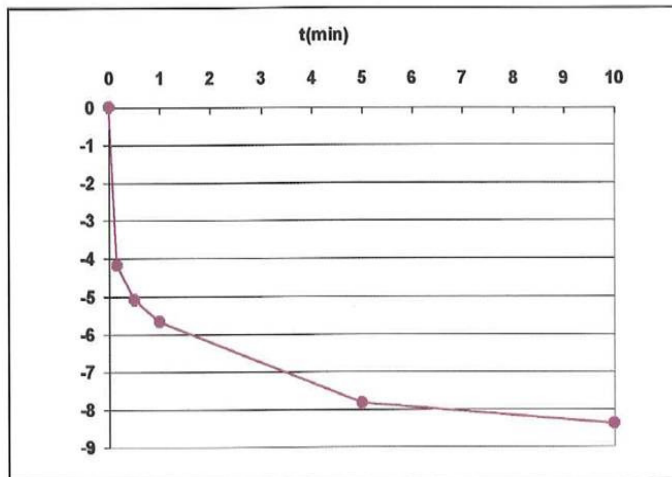
Tal y como puede observarse, la cloración y la ozonización eliminan totalmente la contaminación microbiológica existente. En el resto de las etapas, la inactivación conseguida fue mucho menor.

La **Figura 2** muestra el poder desinfectante del cloro en función del tiempo. Sin embargo, en el tratamiento con ozono, **Figura 3**, la dosis de ozono que actúa sobre la muestra es continua a lo largo del tratamiento por lo que los resultados deben referenciarse en función de dicha dosis, como  $\text{mgO}_3/\text{l}$ .

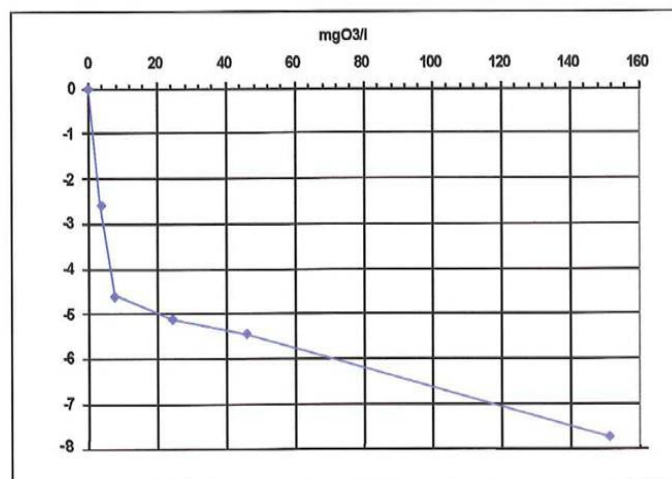
En el tratamiento de precipitación química, se produce una inactivación de sólo 0,19 unidades logarítmicas. Esta etapa, por definición, tiene como objetivo eliminar la materia en suspensión presente en el agua por lo que puede observarse la reducción de su turbidez al final. Como muestra el apartado correspondiente en la **Tabla 3**, la turbidez pasa de 39,05 a 9,11 NTU, aunque no influye mucho en la desinfección.

La etapa de adsorción con carbón activo tiene como objetivo la eliminación de contaminantes orgánicos e inorgánicos y tal y como puede observarse, produce una inactivación bacteriana de tan sólo 0,3 unidades logarítmicas. *Clostridium perfringens* no tiene tendencia a adsorberse en la superficie del carbón.

Tras la etapa de filtración en arena, se produce una reducción en la turbidez de la muestra de 12 NTU y una eliminación bacteriana de 1,32 unidades logarítmicas. La filtración no destruye la contaminación microbiológica sino que la transfiere de un medio a otro. En consecuencia, tras sucesivos ciclos de operación, es



**Figura 2.** Curvas de inactivación de *C. perfringens*: inactivación vs. tiempo en la preoxidación con  $\text{Cl}_2$ .



**Figura 3.** Curvas de inactivación de *C. perfringens*: inactivación vs.  $\text{mgO}_3/\text{l}$  en la preoxidación con  $\text{O}_3$ .

importante realizar ciclos de lavado intensivo de la misma, recirculando el agua a cabecera de planta para ser desinfectada de nuevo ya que puede poseer una carga microbiológica relevante. Así mismo es altamente conveniente que el agua filtrada haya sido previamente desinfectada para que la arena no constituya un reservorio de microorganismos.

### 4. Conclusiones

Las etapas verdaderamente importantes en la desinfección son

la preoxidación, ya sea con hipoclorito sódico o con ozono, consiguiéndose recuentos finales nulos en las condiciones estudiadas. En las etapas de afino con carbón activo y coagulación-floculación-decantación hay una pequeña eliminación bacteriana (0,3 y 0,16 log respectivamente), pero es irrelevante, no siendo eliminados sino transferidos a los fangos, que posteriormente deberán ser tratados. Por último, en la etapa de filtración se produce una mayor eliminación



## ARTÍCULOS TÉCNICOS

Tabla 3

Parámetro	Preoxidación NaClO		Preoxidación O <sub>3</sub>		Precipitación química		Adsorción Carbón activo		Filtración arena	
	Bruta	Tratada	Bruta	Tratada	Bruta	Tratada	Bruta	Tratada	Bruta	Tratada
pH	7,7	7,9	8,12	7,43	7,57	7,32	7,16	7,82	7,16	7,57
Tª (°C)	21,0	21,1	21,5	21,7	28,4	26,9	14,4	12,1	14,4	11,6
Conductividad (µ/cm)	764	759	898	781	778	799	1.567	1.564	1.567	1.564
Turbidez (NTU)	33,24	30,12	39,34	49,16	39,05	9,11	22,64	22,67	22,64	10,82
<i>C. perfringens</i> UFC/100ml	2,5·10 <sup>8</sup>	<1	5,5·10 <sup>7</sup>	<1	3·10 <sup>5</sup>	2·10 <sup>5</sup>	8,7·10 <sup>6</sup>	4·10 <sup>6</sup>	8,7·10 <sup>6</sup>	4·10 <sup>5</sup>
Inactivación bacteriana Log (Nt/No)		-8,39		-7,74		-0,19		-0,3		-1,31

Tabla 3. Resultados fisicoquímicos y microbiológicos al inicio y finalización de las distintas etapas estudiadas.

de *C. perfringens* (1,32 log) respecto a las etapas anteriores, pero es debido a la retención bacteriana en el lecho de arena, por lo que simplemente hay una transferencia de contaminación microbiológica y no realmente una eliminación bacteriana. El agua potable obtenida al final del tratamiento de potabilización cumple de manera adecuada con los criterios exigidos por la actual legislación vigente.

Este estudio asienta las bases para una futura investigación en el campo de las técnicas de oxidación avanzada basadas en ozono, con futuro prometedor en desinfección a muchos niveles.

### 5. Agradecimientos

Los autores agradecen el soporte financiero de este trabajo a la Secretaría de Estado de Universidades e Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia

(Proyecto CTM2005-04585) y al Departamento de Ciencia, Tecnología y Universidad del Gobierno de Aragón por la concesión de una beca predoctoral a Dña. Munia Lanao. También agradecen a la Dra. Durán por la amable cesión de la cepa clínica de *C. perfringens* así como su asesoría técnica y a la Dra. Martínez-Bordenave por su colaboración y apoyo.

### 6. Bibliografía

- [1] Borrego J.J., Cómox R., Morínigo M.A., Martínez-Manzanares E. and Romero P. (1990) "Coliphages as an indicator of faecal pollution in water. Their survival and productive infectivity in natural aquatic environments". Water Research, 24 (1), 111-116.
- [2] Directiva 98/83/CE de 3 de noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas destinadas

al consumo humano. Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE), n° L 330, 5 de Diciembre de 1998.

- [3] Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.
- [4] Payment P. and Franco E. (1993) "Clostridium perfringens and Somatic Coliphages as Indicators of the Efficiency of Drinking Water Treatment for Viruses and Protozoan Cysts."
- [5] Applied and Environmental Microbiology, 59 (8), 2418-2424.
- [6] UNE-EN 26461-2 (ISO 6461-2:1986): "Calidad del agua. Detección y recuento de los esporos de microorganismos anaerobios sulfito-reductores (clostridia). Parte 2 : Método de filtración por membrana."



# Bactericidal Effectiveness of $O_3$ , $O_3/H_2O_2$ and $O_3/TiO_2$ on *Clostridium perfringens*

M. Lanao, M.P. Ormad, C. Ibarz, N. Miguel, and J.L. Ovelleiro

Department of Chemical Engineering and Environmental Technologies, University of Zaragoza, Pedro Cerbuna, Zaragoza, Spain

*The purpose of this research is to evaluate the bactericidal capacity of different Advanced Oxidation Treatments (AOTs) based on ozone: ozone, ozone/hydrogen peroxide and ozone/titanium dioxide on a wild strain of Clostridium perfringens, a fecal bacterial indicator in drinking water. The dose of ozone consumed ranges from 0.6 mg L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> to 5.13 mg L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> depending on the process and on the sample. In the treatments combined with O<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dose utilized is 0.04 mM and TiO<sub>2</sub> dose, 1 g L<sup>-1</sup>. In order to evaluate the influence of natural organic matter and suspension solids over the disinfection rate, treatments are performed with two types of water – natural water from Ebro River (Zaragoza, Spain) and NaCl solution 0.9%. To achieve 4 log units of inactivation, 3.6 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> is necessary in O<sub>3</sub> treatment, 4.25 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> in O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> system and 2.7 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> in O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after processing the natural water. In NaCl solution, to get the same inactivation, 0.42 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> is necessary in O<sub>3</sub> treatment, 1.15 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> in O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> system and 0.06 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> in O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process. Even though the three treatments studied have a high bactericidal activity due to the number of surviving bacteria decreases to non-detectable levels, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is the most effective system for eliminating C. perfringens cells in a lower contact time, followed by O<sub>3</sub> and finally O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> system.*

**Keywords** *Clostridium perfringens*, Ozone, Hydrogen Peroxide, Titanium Dioxide, Drinking Water, Disinfection, Advanced Oxidation

## INTRODUCTION

Historically, the transmission of pathogenic microorganisms through the water has been the more serious source of epidemics in some diseases. In 1854, London suffered a cholera epidemic, being one of the early diseases

to be recognized as a waterborne illness (Bates, 2000). Nowadays, the list of waterborne diseases is considerably longer and it includes bacteria, viruses and protozoa. Above all, underdeveloped countries are the most affected by these types of diseases due to problems of access to drinking water sources (EPA, 1999).

Due to the pollution of natural water by substances which come from the environment and from the massive and indiscriminate use of the human, this type of water, generally, cannot be used for a certain use without a previous correction of one of several parameters. If the purpose of water is the human consumption, the application of a previous process called potabilization is necessary and it is carried out in facilities created with this aim called drinking water plants. Potabilization process has as objectives the elimination from natural waters of pathogenic microorganisms (disinfection) and the elimination of organic and inorganic pollutants (oxidation). Drinking water disinfection provides the final barrier to transmission of a wide variety of potentially waterborne infectious agents.

Most of pathogenic microorganisms are discharged into natural waters through wastewaters and their presence indicates fecal pollution, representing a public health risk. In contrast to chemical pollutants, a lower tolerable limit for microbiological pollutants is not allowed in analysis of water for human consumption, due to a little quantity of pathogens into a host is capable of developing an infection, even the death of the host. So, water for consumption, cooking and drinking and personal hygiene must not contain any pathogenic agent for human beings (WHO, 1995). This characteristic turns the microbiological analysis of water in a vital analysis.

Consequently to the founding in Europe of the Directive 98/83/CE on quality of water for human consumption, a systematic control about fecal bacterial indicators must be made in this type of water. This new Directive has included the bacterium *Clostridium perfringens* as a new microbiological parameter to check because the traditional indicators

Received 3/12/2008; Accepted 8/15/2008

Address correspondence to M. Lanao, Department of Chemical Engineering and Environmental Technologies, University of Zaragoza, Pedro Cerbuna, 12. 50009, Zaragoza (Spain). E-mail: mlanao@unizar.es

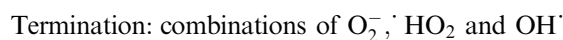
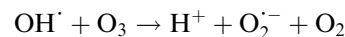
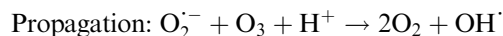
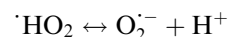
(such as *Escherichia coli* and coliforms) are inactivated in a short time with the conventional disinfection treatments of water, as the chlorine (Payment, 1999) creating a false sense of security. Several researches have reported that traditional bacterial indicators often indicate water is free of fecal pollution, although viruses, protozoa and bacteria which form spores appear in it, showing that these indicators are not completely reliable (Gesche, 2003). *C. perfringens*, in view of adverse situations, forms spores and survives in water for much longer than coliforms. Therefore, its presence in disinfected water can indicate the treatment has been deficient and maybe, other resistant pathogens have also survived. So, in the last years it has been reported that *C. perfringens* could be a suitable indicator for the presence of pathogens of fecal origin in surface waters (Payment and Franco, 1993; Hijnen et al., 2000) and a biological indicator of disinfection efficiency in water systems, so it has been selected to perform this research. *C. perfringens* is included in the Spanish Drinking Water Decree (Royal Decree 140/2003) as part of the microbiological standards for drinking water, monitoring in 100 mL samples at surface water treatment plants.

Conventional water treatment includes a group of processes (preoxidation, activated carbon adsorption, coagulation-flocculation-decantation, intermediate oxidation, sand filtration and post-chlorination) that when are applied to raw water sources contribute to the reduction of microorganisms of public health concern. Although chlorine is the most common water disinfectant currently in use in the world, undesired by-products such as trihalomethanes are formed. These disinfection by-products exhibit a potentially carcinogenic activity and as consequence, it has made possible its gradual substitution by other agents as ozone. However, it will be used as disinfectant in the final disinfection for much longer because chlorine is the only agent with residual power, ensuring the arrival of disinfected water to points of consumption (Bueno, 1997).

Today, new processes called advanced oxidation techniques (AOTs) are being researched as an alternative for the removal of particular pollutants in water and so, to avoid the generation of dangerous by-products during drinking water treatment. These techniques generate high concentrations of hydroxyl radicals, highly reactive chemical species.

Ozone in water can follow two pathways: direct oxidation of compounds by molecular ozone and indirect oxidation through hydroxyl free radicals produced during the decomposition of ozone and from reactions between ozone and some organic and inorganic species in water (Hoigné and Bader, 1983). Hoigné and Bader (1997) found that under acidic conditions, the direct oxidation with molecular ozone is of primary importance. Under conditions favoring hydroxyl free radical production, such as high pH, exposure to UV or addition of hydrogen peroxide, the hydroxyl oxidation stars to dominate. As well as the hydroxyl radicals, other radicals are generated such as superoxide, ozonide and

hydroperoxide radicals. The chain mechanism is describing next (Kuo et al., 1999):



At pH of natural water, both mechanisms of ozone reaction can coexist. In order to favor the radical scheme of ozone reaction, some substances can be added to ozone producing AOTs. The ozone decomposition by the radical scheme can increase with the presence of  $\text{OH}^-$ , hydrogen peroxide, photolysis by ultraviolet radiation and metallic catalysts (Oppenländer, 2003).

The result of the addition of hydrogen peroxide to ozone is the peroxone system.  $\text{H}_2\text{O}_2$  is a very important initiator, which may influence the ozonation process. After adding hydrogen peroxide to ozone, one part of this is dissociated to  $\text{HO}_2^{\cdot}$  which has a higher ability of initiation than  $\text{OH}^-$  and accelerates the decomposition of ozone. The result of the addition of titanium dioxide to ozone is the catalytic ozonation process. The catalyst may decompose the ozone into free radicals or adsorb one or both reactants (ozone and pollutants) making easier their reactions.

It is not well understood which mechanism is responsible for the inactivation of microorganisms: the molecular ozone or the intermediate radicals formed. Some researchers believe that ozone disinfection is a result of direct ozone reaction (Finch et al., 1992; Hunt and Mariñas, 1999; Labatiuk et al., 1994) while others believe that the hydroxyl radical mechanism for disinfection is the most important mechanism (Bancroft, 1984). The first site to be attacked seems to be the bacterial membrane. It also disrupts enzymatic activity of bacteria by acting on the sulfhydryl groups of certain enzymes. Beyond the cell membrane and cell wall, ozone may act on the nuclear material within the cell (Giese and Christensen, 1954). Despite, the sensibility of microorganisms to ozone is affected by the organic matter present in water and by the physicochemical parameters (Bezirtzoglou et al., 1994).

So, the aim of this research is to compare the disinfectant capacity of several new oxidation techniques which are being studied in the last years as a substitute of the chlorine in the preoxidation and intermediate oxidation stages in the drinking water treatment, that is  $\text{O}_3$  (ozonation) and  $\text{O}_3$  combined with  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peroxone)



and  $\text{TiO}_2$  (catalytic ozonation) on a population of *C. perfringens* and to evaluate in which grade the organic matter in a surface natural water improves or makes worth that inactivation.

## MATERIAL AND METHODS

### Samples

Disinfection treatments are carried out with two different types of water: natural water and NaCl 0.9% solution. Water samples are collected from the Ebro River, higher up of the entrance point to the drinking water plant in Zaragoza. A sample of 25 liters is distributed in recollection bottles ISO with a volume of 1 Liter. Samples are conserved at  $-20^\circ\text{C}$  for a perfect support. Total Organic Carbon (TOC) of the natural sample is  $3 \pm 1 \text{ mg L}^{-1}$ . The NaCl solution is prepared from sodium chloride reactive (Panreac) dissolved in ultrapure milliQ<sup>®</sup> water up to get a solution 0.9% and with a pH similar to natural water to work in the same conditions.

Samples, in a natural way, present a low concentration on *C. perfringens* ( $3-5 \cdot 10^2 \text{ CFU/100 mL}$ ) and it is necessary to increase this population in an artificial way, to fortify them. So, a cell concentrated suspension is prepared. For this, a wild *C. perfringens* strain isolated from Ebro River is incubated on the enrichment Schaedler agar (Scharlab) with 5% defibrinated sterile sheep blood. After 24 h at  $37^\circ\text{C}$ , cells are carefully transferred from the agar layer and suspended in saline solution. The mixing natural water or NaCl solution with the cell suspension is the sample to study. These fortified samples have initial populations of *C. perfringens*, which range from  $10^6$  to  $10^8 \text{ CFU/100mL}$ .

### Analysis of Physical-Chemical Parameters

Table 1 shows the relation of physicochemical parameters used in the characterization of samples, just as the analytic methodology and instrumentation related.

### Test *Clostridium perfringens*

The culture and enumeration of *C. perfringens* is carried out according to the procedure ISO 6461-2:1986. The analysis of the samples is performed by the method membrane filtration. Sterile cellulose membranes (Millipore) of  $0.22 \mu\text{m}$  pore size and 47 mm diameter are used. After a sample is filtered under vacuum, the

membrane is placed into a Petri dish, agar SPS (Scharlab) is poured on it and is incubated in anaerobic jars (Oxoid) at  $37^\circ\text{C}$ . After 18–24 h, black colonies are counted and Gram stain is made as confirmation test from some of them.

From each sample taken, several different volumes are filtered to ensure a reliable count in each sampling time. The enumeration of colonies is explained as CFU (colony-forming units) per 100 mL of sample in each contact time. These concentrations are transformed to  $\log_{10}$  and the removal of bacteria,  $\text{Log}(N_t/N_0)$ , is calculated from the initial *C. perfringens* population ( $N_0$ ) and the remaining *C. perfringens* population at time  $t$  ( $N_t$ ).

## OZONATION, PEROXONE AND CATALYTIC OZONATION ON LABORATORY SCALE

### Materials

All glassware used is autoclaved at  $121^\circ\text{C}$  for 15 min. to be sterile. All solutions and culture mediums are prepared with ultrapure MilliQ<sup>®</sup> water and analytical-reagent grade chemicals are used throughout.

The catalyst used in this study is treated  $\text{TiO}_2$  obtained from commercial  $\text{TiO}_2$  100% anatase (Panreac). Treated  $\text{TiO}_2$  is obtained by a thermal treatment that consists of a heating at  $900^\circ\text{C}$  for 12 h. After cooling down until room temperature,  $\text{TiO}_2$  was pressed, crushed and sieved to obtain a particle diameter of 0.5 mm. It is characterized by FTIR and BET Methods. Specific area is  $6.43 \text{ g m}^{-2}$ . FTIR shows that treated  $\text{TiO}_2$  is a mixture of 80% anatase and 20% rutile. The solution of hydrogen peroxide is prepared from a concentrated  $\text{H}_2\text{O}_2$  solution at 30% by weight (Carlo Erba, quality for analysis).

### Ozone Generator

Ozonation experiments are performed with ozone generated “in situ” in the laboratory from dry prefiltered oxygen by using a Fischer Model 500 ozone generator. Ozone generator consists of two electrodes. A high voltage is produced between them and pure oxygen current flows through them. A discharge occurs and atomic oxygen is produced. When atomic and molecular oxygen are combined, an ozone molecule is generated. The ozone generator is connected to a glass closed reactor where sample is located and the ozone gas is transferred to

TABLE 1. Physical-Chemical Parameters Analysis

Parameter	Instrument	Brand	Model	Error	Standard Method
pH	pH-meter	Crison	GLP 21	$\leq 0.02 \text{ pH} \leq 0.3^\circ\text{C}$	4500-HB Standard Methods
Conductivity	Conductimeter	Crison	Basic 30	$\leq 0.5^\circ\text{C}$	Norma UNE-EN 27888:1994
Ozone residual	Ozone Photometric Tester	Merck	DPD	$\leq 2.0\%$	
Total Organic Carbon (TOC)	TOC tester	Shimadzu	TOC-Vcsh	5–10%	5310 B Standard Methods

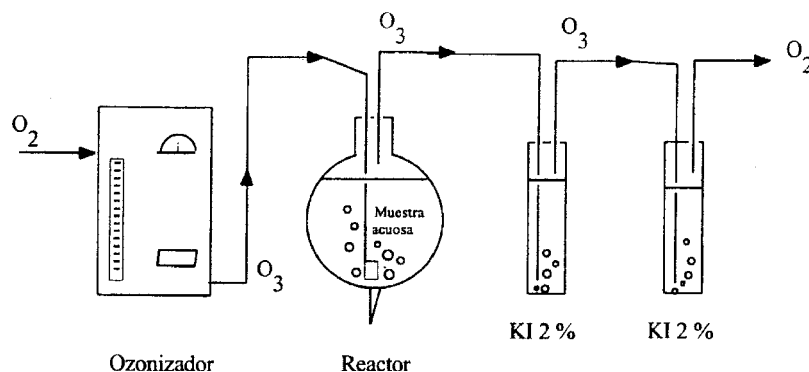


FIGURE 1. Diagram of the ozonation equipment.

it through a bubble diffuser contactor ( $O_{3\text{generated}}$ ). This reactor works in semi-continuous mode: continuous to gas and discontinuous to liquid. All experiments are conducted in the ozonation reactor described in Figure 1.

Ozone not transferred into the process water during contacting is released from the reactor as  $O_{3\text{ no consumed}}$ . This  $O_{3\text{ no consumed}}$  is routed to two ozone destruct units containing 250 mL of a 2% KI solution. When the ozone reacts with this KI, it is reduced to oxygen and is releasing to the atmosphere as an innocuous element.

Both ozone generated and ozone not consumed are calculated by a iodometric method (Kolthoff and Belchor, 1957). Ozone residual, dissolved in the sample, is measured by a color-meter test (Merck) associated to UV/Vis spectrophotometer (Thermospectronic, Helios  $\alpha$ ). Therefore, the ozone consumed by the sample is calculated according to the next formula:

$$O_3 \text{ consumed} = O_3 \text{ generated} - O_3 \text{ no consumed} - O_3 \text{ residual dissolved.}$$

In the  $O_3/\text{TiO}_2$  and  $O_3/\text{H}_2\text{O}_2$  experiments, the  $\text{TiO}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  are added into the reactor at the same time that the ozone begins to spread through the sample.

In order to compare the results obtained with the three types of disinfection systems, these results are expressed as  $\text{mg } O_3 \text{ L}^{-1}$  because of the initial volume in the reactor changes after taking the samples along the experiment, varying the ozone concentration applied.

## Operation Conditions

The three treatments are carried out with each type of sample at room temperature in triplicate. The reactor used to house the sample is made of Pyrex glass. It is spherical and has a capacity of 3 L. Each treatment lasts 10 min. and the initial sample volume is 1.5 L. Ozone generator produces  $577.6 \text{ mg } O_3 \text{ h}^{-1}$  using an oxygen flow of  $100 \text{ L } O_2 \text{ h}^{-1}$ . The ozone consumed is around  $3.5\text{--}3.8 \text{ mg } O_3 \text{ L}^{-1} \text{ min}^{-1}$  in natural water. In NaCl solution, the ozone consumed ranges from  $0.6\text{--}2.9 \text{ mg } O_3 \text{ L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .

The dose of  $\text{TiO}_2$  added in  $O_3/\text{TiO}_2$  system is  $1 \text{ g } \text{L}^{-1}$  and the  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration utilized in  $O_3/\text{H}_2\text{O}_2$  process is  $0.04 \text{ mM}$ . As well as these three experiments made with ozone as common element, two control experiments are carried out:  $\text{TiO}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  alone. At different intervals of time, samples are taken into sterile glass bottles with sodium thiosulphate to neutralize the residuals of ozone and hydrogen peroxide and so, to avoid these components go on exerting their bactericidal action.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Physical and Chemical Results

Results relating to analysis of physicochemical parameters in each contact time in the experiments performed are shown in Tables 2 and 3. Table 2 shows the results obtained using the natural sample and Table 3 the results from the synthetic sample. There is not a significant

TABLE 2. Physicochemical Results of Experiments Realized in Natural Fortified Sample

Sampling time (min)	Ozone residual ( $\text{mg } \text{L}^{-1}$ )			pH			Conductivity ( $\mu\text{S } \text{cm}^{-1}$ )		
	$O_3$	$O_3 + \text{H}_2\text{O}_2$	$O_3 + \text{TiO}_2$	$O_3$	$O_3 + \text{H}_2\text{O}_2$	$O_3 + \text{TiO}_2$	$O_3$	$O_3 + \text{H}_2\text{O}_2$	$O_3 + \text{TiO}_2$
0	0	0	0	7.32	7.71	7.66	574	610	595
0.5	0.042	0.054	0.136	7.33	7.73	7.77	589	605	597
1	0.035	0.036	0.084	7.58	7.75	7.81	553	584	607
5	0.022	0.004	0.082	7.60	7.97	7.87	577	611	595
10	0.008	0	0.074	7.88	8.11	7.87	798	611	611

**TABLE 3.** Physicochemical Results of Experiments Realized in NaCl Solution

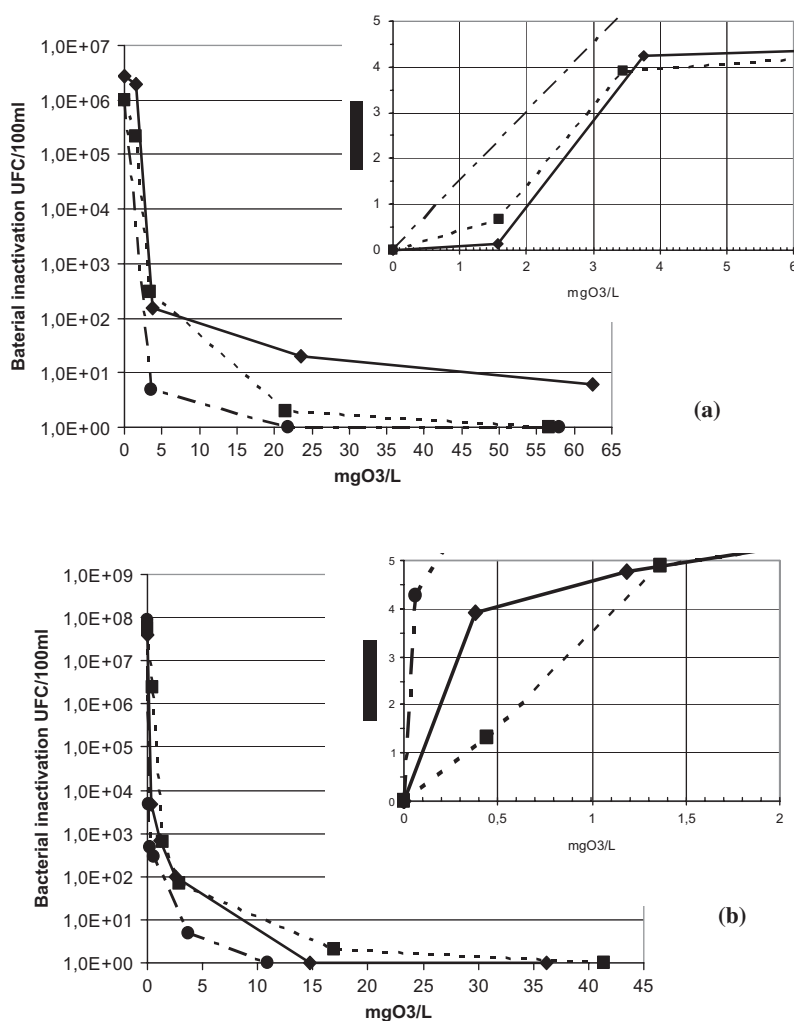
Sampling time (min)	Ozone residual (mg L <sup>-1</sup> )			pH			Conductivity (ms cm <sup>-1</sup> )		
	O <sub>3</sub>	O <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	O <sub>3</sub> + TiO <sub>2</sub>	O <sub>3</sub>	O <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	O <sub>3</sub> + TiO <sub>2</sub>	O <sub>3</sub>	O <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	O <sub>3</sub> + TiO <sub>2</sub>
0	0	ND	0	6.72	7.96	6.42	14.80	14.95	14.76
0.17	0.024	ND	0.234	7.56	7.84	6.40	14.92	14.98	14.81
0.5	0.028	ND	0.140	8.61	7.73	6.41	14.99	15.01	14.86
1	0.022	ND	0.144	7.78	7.69	6.38	14.89	14.91	14.95
5	0.030	ND	0.126	6.87	7.31	6.32	14.73	14.96	14.80
10	0.020	ND	0.118	6.77	7.10	6.23	14.85	14.91	14.85

ND: no data

variation in pH and conductivity values after the processes studied. It is important to remark that there is not any important modification in the TOC along the different treatments.

### Influence of Natural Organic Matter on the Survival of *C. perfringens*

If the treatments of ozonation, peroxone and catalytic ozonation are compared in each type of sample, as Figure 2



**FIGURE 2.** Inactivation curves of *C. perfringens* exposed to O<sub>3</sub> (◆), O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (●) and O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> (■) treatments in natural fortified water (a) and in NaCl solution (b) as a function of mgO<sub>3</sub>/L.

shows, the inactivation curves of *C. perfringens* in the NaCl solution show faster inactivation than those with natural water.

Figure 2a shows that in natural sample, the bacterial concentration decreases slower and it is necessary a higher dose of ozone to get the same level of inactivation than in NaCl solution. To achieve 4 units log of inactivation or 99.99% reduction, 3.6 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> is necessary in O<sub>3</sub> treatment, 4.25 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> in O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> system and 2.7 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> in O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the natural sample. However, as we can observe in Figure 2b, to achieve the same inactivation, 0.42 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> in O<sub>3</sub> treatment, 1.15 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> in O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> system and 0.06 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> in O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process is necessary in the synthetic sample.

There is a correlation between these results obtained and the fact that the presence of organic matter reduces the inactivation kinetics by competing with bacteria for the different oxidant species formed along the treatment (Ireland, 1993). The microbial aggregates can also affect the efficiency of disinfection because a fortress is created in the presence of disinfectants. As Hunt and Mariñas (1999) suggest, the dissolved ozone is decomposed in a way faster in the presence of humic acids and, so, bacteria are less exposed to the disinfectant, being slower their inactivation. Ozone reacts with dissolved, colloidal and particulate matter existing in natural water and these reactions might interfere with some of the reactions responsible for *C. perfringens* inactivation. However, in NaCl solution, there is not any natural organic matter except for integral components of the bacterial cell membranes and so, ozone and hydroxyl radicals only can attack organic structures of the bacterial membranes, altering their composition and functions and causing their death much faster. So, the slope in the curve is greater.

In Tables 4 and 5, the bacterial logarithmic inactivation as a function of the contact time and of the quantity of mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> is represented in the natural water and in the NaCl solution respectively. It is important to mention that the high level of logarithmic inactivation is different in each experiment carried out due to the different initial concentrations of bacteria because of the inherent difficulty of preparing the bacterial suspension. In all cases, the removal of bacteria gets non-detectable levels by the method of analysis, considering a total and successful

disinfection. In the control experiments carried out with TiO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in absence of O<sub>3</sub>), there is not practically removal of *C. perfringens*, so they have a weak bactericidal activity in water disinfection by themselves.

### Disinfection of O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> in Natural Water

If we pay attention in Figure 2a, the most effective treatment to achieve faster levels of inactivation on the initial population of *C. perfringens* is the combined O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. It removes 4 units log in a lower contact time, being this reduction, a suitable disinfection (Venczel et al., 2004). The addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increases the bactericidal effect that ozone itself has, getting a reduction of 4 log units in 45 sec. with a dose of 2.7 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> against the 58.2 sec. with O<sub>3</sub> alone and a dose of 3.6 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>. This combination favors the production of high-energy hydroxyl radicals (OH\*) from the accelerated decomposition of ozone by hydrogen peroxide (Glaze et al., 1987; Staehelin and Hoigné, 1982). The indirect pathway of ozone is favored in respect of the direct one due to the conversion of ozone molecules to hydroxyl radicals, increasing their concentration with respect to O<sub>3</sub> system and so, doing more efficiency the peroxone treatment in the conditions studied.

Similar results are shown by Cho and Yoon (2006) after a study about the enhanced bactericidal effect of the peroxone followed by chlorination on *Bacillus subtilis* spores, suggesting this system as a viable alternative when O<sub>3</sub> alone does not satisfy the disinfection requirement and reporting that the OH radical itself is much more effective in inactivating microorganisms than ozone molecule.

With respect to the O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> system, to achieve a reduction of 4 units log, a contact time of 1.2 minutes and 4.25 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> is necessary. It is the slowest system but the disinfection is adequate. In the catalytic ozonation in natural water, several mechanisms are produced at the same time: the ozonation in the medium of the constituents dissolved by means of a direct pathway of the molecular ozone and an indirect mechanism of the radical species formed from the autodecomposition of ozone and the ozonation on the surface of TiO<sub>2</sub> catalyst of the

**TABLE 4.** Logarithmic Inactivation of *C. perfringens* and the Respective dose of Ozone Consumed in Natural Fortified Sample

Contact time (min)	Ozone consumed (mg L <sup>-1</sup> )			<i>C. perfringens</i> inactivation (Log Nt/No)		
	O <sub>3</sub>	O <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	O <sub>3</sub> + TiO <sub>2</sub>	O <sub>3</sub>	O <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	O <sub>3</sub> + TiO <sub>2</sub>
0	0	0	0	0	0	0
0.5	1.57	1.64	1.6	-0.2	ND	-0.7
1	3.76	3.53	3.46	-4.3	-5.3	-3.9
5	23.5	21.9	21.42	-5.1	-6.0	-5.7
10	62.5	57.97	56.7	-5.7	-6.0	-6.0

**TABLE 5.** Logarithmic Inactivation of *C. perfringens* and the Respective dose of Ozone Consumed in NaCl Solution

Contact time (min)	Ozone consumed (mg L <sup>-1</sup> )			<i>C. perfringens</i> inactivation (Log Nt/No)		
	O <sub>3</sub>	O <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	O <sub>3</sub> + TiO <sub>2</sub>	O <sub>3</sub>	O <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	O <sub>3</sub> + TiO <sub>2</sub>
0	0	0	0	0	0	0
0.17	0.38	0.066	0.44	-3.9	-4.3	-1.3
0.5	1.19	0.23	1.37	-4.8	-5.3	-4.
1	2.5	0.6	2.88	-5.6	-5.5	-5.8
5	14.73	3.75	16.96	-7.6	-7.2	-7.4
10	36.15	10.9	41.36	-7.6	-8.0	-7.7

particles adsorbed. Gogniat (2006) suggests that both OH radicals and an adsorption of bacteria on active TiO<sub>2</sub> particles take part in disinfection. It is important to remark that the effectiveness of the catalytic ozonation depends on many factors such as the catalyst surface, the pH of the solution, and so on. According to the bibliography reviewed (Nawrocki et al., 1993; Winkler and Marmé, 2002; Beltrán et al., 2002) the pH of point of zero charge TiO<sub>2</sub> is between 5.6 and 6.4. Therefore, as TiO<sub>2</sub> has Lewis acid sites in its surface, at pH worked with the natural sample (7.5–8) the adsorption of pollutants is not effective because the presence of ions OH<sup>-</sup> (strong Lewis bases) that adsorb in the TiO<sub>2</sub> surface preventing pollutants adsorption (Kasprzyk-Hordern et al., 2003).

A common dosage of ozone used in the main drinking water plants is about 3 mg L<sup>-1</sup>, so if this value is taken as a reference, the removal of *C. perfringens* achieved is 2.8 log units in O<sub>3</sub> system, 4.5 log units with O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process and 3.1 units with O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> treatment. So, these results indicate that TiO<sub>2</sub> does not suppose a significant help to the ozone action unlike the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

If the parameter CT is used as tool to compare the disinfectant capacity of different agents (CT is calculated as disinfectant residual (mg L<sup>-1</sup>) multiplied by contact time (min) to achieve a specified level of inactivation) on the inactivation of pathogens, as Table 6 shows, the treatment with the lower value of CT such as to achieve 2 log units or 99% of removal as to achieve 4 log units or 99.99% reduction, is O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. So, this treatment is chosen as the best process to achieve a fast and effective disinfection. It is followed by the O<sub>3</sub> system and finally, O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub>.

## CONCLUSIONS

Advanced Oxidation Processes, O<sub>3</sub> and its combination with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> were conducted to evaluate the bactericidal capacity of these treatments on *C. perfringens*, indicator of fecal pollution. All test *C. perfringens* were inactivated more rapidly by O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than by O<sub>3</sub> and O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> under all conditions tested. The addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to O<sub>3</sub> favors its decomposition increasing the free hydroxyl radical concentration (a 99.99% of removal is achieved with 2.7 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> in 45 seconds in O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment against 3.6 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> and 58.2 sec in O<sub>3</sub> system). However, TiO<sub>2</sub> does not improve in an important way the disinfection efficiency if it is added to ozone (4.25 mgO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> and 1.2 min of treatment). The three treatments studied have a high bactericidal activity due to the number of surviving bacteria decreases to non-detectable levels. Our work also indicates that organic matter in natural water makes difficult the disinfectant capacity of the treatments studied, getting an inactivation faster in NaCl solution than in natural water, due to the particulate matter competes with microorganisms for the actuation of disinfectants.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research is partially financed by the “Secretaría de Estado de Universidades e Investigación” of the Ministry of Education and Science (Spain) with the *Project CTM2005-04585/TECNO* called “*Drinking Water Production By Advanced Oxidation Technologies In River Ebro Basin*”. The authors also thank “Gobierno de Aragón” for the PhD grant to Munia Lanao.

**TABLE 6.** CT(mg·min/L) Parameter to Achieve 2 and 4 Log Units in the Three Treatments Studied

Disinfection treatments	CT for 2 log units	CT for 4 log units
O <sub>3</sub>	0.028	0.032
O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.007	0.030
O <sub>3</sub> /TiO <sub>2</sub>	0.080	0.10

## REFERENCES

- APHA, AWWA, WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association, Washington, DC (2005).
- Bancroft, K., P. Chrostowski, R.L. Wright, and I.H. Suffet, "Ozonation and Oxidation Competition Values", *Water Res.*, 18:473–478 (1984).
- Bates, A.J. "Water as Consumed and its Impact on the Consumer—Do We Understand the Variables?", *Food Chem. Toxicol.*, 38:S29–S36 (2000).
- Beltrán, F.J., F.J. Rivas, and R. Montero de Espinosa, "Catalytic Ozonation of Oxalic Acid in an Aqueous TiO<sub>2</sub> Slurry Reactor", *Appl. Catal. B-Environ.*, 39(3):221–231 (2002).
- Bezirtzoglou, E., D. Dimitrou, A. Panagiou, I. Kagalou, and Y. Demolates, "Distribution of *C. perfringens* in Different Aquatic Environmental in Greece", *Microbiol. Res.*, 149:129–134 (1994).
- Bueno, J.L. *Contaminación e Ingeniería Ambiental. Contaminación de las Aguas* (Oviedo, Spain: F.I.C.Y.T, 1997).
- Cho, M. and J. Yoon, "Enhanced Bactericidal Effect of O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Followed by Cl<sub>2</sub>", *Ozone Sci. Eng.*, 28:335–340 (2006).
- EPA Guidance Manual. *Alternative Disinfectants and Oxidants Office of Water*. US Environmental Protection Agency 815-R-99-OP4 (1999).
- Finch, G.R., W.C. Yuen, and B.J. Uibel, "Inactivation of *Escherichia coli* Using Ozone and Ozone-Hydrogen Peroxide", *Environ. Technol.*, 13:571–578 (1992).
- Gesche, E., A. Vallejos, and M. Saez, "Efficiency of Sulphite-Reducing Bacteria as Sanitary-Indicator for Water. MPN-Method", *Archivos de Medicina Veterinaria*, 35(1):99–107 (2003).
- Giese, A.C. and E. Christensen, "Effects of Ozone on Organisms", *Physiol. Zool.* 27:101 (1954).
- Glaze, W.H., J.W. Kang, and D.H. Chapin, "The Chemistry of Water Treatment Processes Involving Ozone, Hydrogen Peroxide and Ultraviolet Radiation", *Ozone Sci. Eng.*, 9(4):335–352 (1987).
- Gogniat, G., M. Thyssen, M. Denis, C. Pulgarin, and S. Dukan, "The Bactericidal Effect of TiO<sub>2</sub> Photocatalysis Involves Adsorption onto Catalyst and the Loss of Membrane Integrity", *FEMS Microbiol. Lett.*, 258:18–24 (2006).
- Hijnen, W.A., J. Willemsen-Zwaagstra, P. Hiemstra, G.J. Medema, and D. Var der Kooij, "Removal of Sulphite-Reducing Clostridia Spores by Full-Scale Water Treatment Processes as a Surrogate for Protozoan (oo)cysts Removal", *Water Sci. Technol.*, 41(7):165–171 (2000).
- Hoigné, J. and H. Bader, "The Role of Hydroxyl Radical Reactions in Ozonation Processes in Aqueous Solutions", *Water Res.*, 10:377–386 (1977).
- Hoigné, J. and H. Bader, "Rate Constants of Reactions of Ozone with Organic and Inorganic Compounds in Water-I", *Water Res.*, 17: 173–183 (1983).
- Hunt, N.K. and B.J. Mariñas, "Inactivation of *Escherichia coli* with Ozone: Chemical and Inactivation Kinetics", *Water Res.*, 33 (11):2633–2641 (1999).
- Ireland, J.C., P. Klostermann, E.W. Rice, and R.M. Clark, "Inactivation of *Escherichia coli* by Titanium Dioxide Photocatalytic Oxidation", *Appl. Environ. Microb.*, 59(5):1668–1670 (1993).
- ISO 6461-2:1986: "Water quality—Detection and Enumeration of the Spores of Sulfite- Reducing Anaerobes (clostridia)—Part 2: Method by Membrane Filtration".
- Kasprzyk-Hordern, B., M. Ziólek, and J. Nawrocki, "Catalytic Ozonation and Methods of Enhancing Molecular Ozone Reactions in Water Treatment", *Appl. Catal. B-Environ.*, 46:639–669 (2003).
- Kolthoff, I.M. and R. Belcher, *Volumetric Analysis III* (New York: Interscience, 1957), p. 213.
- Kuo, C.H., L. Zhong, M.E. Zappi, and A.P. Hong, "Kinetics and Mechanism of the Reaction between Ozone and Hydrogen Peroxide in Aqueous Solutions", *Can. J. Chem.*, 77:473–482 (1999).
- Labatiuk, C.W., M. Belosevic, and G.R. Finch, "Inactivation of *Giardia muris* Using Ozone and Ozone-Hydrogen Peroxide", *Ozone Sci. Eng.*, 16:67–78 (1994).
- Nawrocki, J., M.P. Rigney, A. McCormick, and P.W. Carr, "Chemistry of Zirconia and its Use in Chromatography", *J. Chromatogr. A*, 657(2):229–282 (1993).
- Oppenländer, T. *Photochemical Purification of Water and Air* (Germany: Wiley-VCH: 2003).
- Payment, P. and E. Franco, "*Clostridium perfringens* and Somatic Coliphages as Indicators of the Efficiency of Drinking Water Treatment for Viruses and Protozoan Cysts", *Appl. Environ. Microb.*, 59(8):2418–2424 (1993).
- Payment, P. "Poor Efficacy of Residual Chlorine Disinfectant in Drinking Water to Inactivate Waterborne Pathogens in Distribution Systems", *Can. J. Microb.*, 45:709–715 (1999).
- Staehelin, J. and J. Hoigné, "Decomposition of Ozone in Water: Rate of Initiation by Hydroxide Ions and Hydrogen Peroxide", *Environ. Sci. Technol.*, 1 (10):676–681 (1982).
- Venczel, L.V., C.A. Likirdopulos, C.E. Robinson, and M.D. Sobsey, "Inactivation of Enteric Microbes in Water by Electrochemical Oxidant from Brine (NaCl) and Free Chlorine", *Water Sci. Technol.*, 50(1):141–146 (2004).
- Winkler, J. and S. Marmé, "Titanium as a Sorbent in Normal Phase Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A.*, 888(1–2):51–62 (2002).
- World Health Organization, "Guías para la calidad del agua potable. Vol. 1. *Recomendaciones*", ISBN 92-4-354460-8 (1995).



# Inactivation of *Clostridium perfringens* spores and vegetative cells by photolysis and TiO<sub>2</sub> photocatalysis with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

M. Lanao<sup>a,\*</sup>, M.P. Ormad<sup>a</sup>, P. Goñi<sup>b</sup>, N. Miguel<sup>a</sup>, R. Mosteo<sup>a</sup>, J.L. Ovelleiro<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemical Engineering and Environmental Technologies, Science Faculty, University of Zaragoza, 12 Pedro Cerbuna Street, Zaragoza 50009, Spain

<sup>b</sup> Department of Microbiology, Preventive Medicine and Public Health, Faculty of Medicine, University of Zaragoza, s/n Domingo Miral Street, Zaragoza 50009, Spain

Received 28 October 2009; received in revised form 22 January 2010; accepted 27 January 2010  
Available online 23 February 2010

Communicated by: Associate Editor Gion Calzaferri

## Abstract

Due to public health concerns related to the generation of dangerous by-products from conventional systems of water disinfection, innovative technologies based on the generation of oxidant radicals are being developed. The aim of this work is to evaluate the bactericidal activity of different treatments with light ( $\lambda$ : 320–800 nm), TiO<sub>2</sub> (1 g L<sup>-1</sup>) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.04 mM) on the viability of vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens*. After spiking a natural water sample (from the Ebro River, Zaragoza (Spain)), the population of vegetative cells was of 10<sup>8</sup> CFU·100 mL<sup>-1</sup> and of spores about 10<sup>3</sup> CFU·100 mL<sup>-1</sup>. Treatments without radiation source (TiO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) show a poor level of inactivation (<0.5 log) on both bacterial forms. The light treatment achieves a vegetative cell inactivation of 1.2 log after 5 min of treatment and <0.5 log on spores after 30 min. The combined light/TiO<sub>2</sub> system increases the level of disinfection with a vegetative cell removal in the order of 6 log after 5 min and 0.6 log of spores after 5 min. Light/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and light/TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments also significantly increase the disinfection of vegetative cells of *C. perfringens* (>6 log). Regarding spores, light/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and light/TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments achieve constant inactivation of 1 log after 5 min of treatment. The application of a light/TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment does not increase the level of inactivation with regard to the level reached by the light/TiO<sub>2</sub> and light/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> systems. This fact shows there is no a significant interaction between TiO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> under the conditions studied.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** *Clostridium perfringens*; Water disinfection; Spores; Sunlight; Photocatalysis

## 1. Introduction

One of the great achievements of the 20th century for the well-being of mankind has been, from a public health and disease prevention viewpoint, the provision of drinking water. This improvement is evident in developed countries, although nowadays frequent outbreaks by waterborne

transmission are still common (OECD, 2000). However, this improvement is not a reality in many other countries in Latin America and Africa (Rodrigues et al., 2007).

Conventional disinfection treatments of natural waters are commonly based on chlorine. Due to its low cost and easy handling, chlorine has been the most commonly used agent for achieving an acceptable removal of pathogenic microorganisms in natural waters. However, dangerous by-products detected in chlorinated water are generating a substitution of chlorine as primary disinfectant little by little (Boorman et al., 1999).

Of these by-products, the most important are trihalomethanes (THMs), potentially dangerous substances for

\* Corresponding author. Tel.: +34 976761877; fax: +34 976764221.

E-mail addresses: [mlanao@unizar.es](mailto:mlanao@unizar.es) (M. Lanao), [mpormad@unizar.es](mailto:mpormad@unizar.es) (M.P. Ormad), [pgoni@unizar.es](mailto:pgoni@unizar.es) (P. Goñi), [nmiguel@unizar.es](mailto:nmiguel@unizar.es) (N. Miguel), [mosteo@unizar.es](mailto:mosteo@unizar.es) (R. Mosteo), [oveleiro@unizar.es](mailto:oveleiro@unizar.es) (J.L. Ovelleiro).

human health (Environmental Protection Agency, 1999). The quantity of THMs generated depends on the NOM concentration existing in the water undergoing treatment. Research has therefore been directed towards new techniques which avoid the generation of these harmful substances.

Nowadays, photolysis is an important alternative in the field of drinking water and wastewater disinfection strategies. The disinfecting properties of photolysis have been studied previously (McGuigan et al., 1998; Robertson et al., 2005). However, factors as water turbidity or regrowth of bacteria after solar treatments can affect in the effectiveness of process (Rincón and Pulgarin, 2004).

To obtain better results, photolysis can be combined with a catalyst (photocatalysis) which increases the reaction rate after being activated with the energy from light. The use of titanium dioxide as a photocatalyst for water treatment has frequently been reported (Robertson et al., 2005; Maness et al., 1999; Rincón and Pulgarin, 2004). TiO<sub>2</sub> photocatalysis is an advanced oxidation technology that could be an alternative to conventional disinfection processes (Rincón and Pulgarin, 2003). This technique does not require the addition of consumable reagents and harmful by-products are not generated.

When a semi-conductor such as TiO<sub>2</sub> is irradiated with near ultraviolet light ( $\lambda < 400$  nm), electron ( $e^-$ )/hole ( $h^+$ ) pairs are generated in the conduction band and valence band respectively. These holes and electrons are involved in the development of redox reactions. The holes on the catalyst surface react with  $^-OH$  ions and with H<sub>2</sub>O molecules generating hydroxyl radicals. At the same time, the excited electrons react with oxygen molecules present in the water, generating more oxidant intermediate species and precursors of  $\cdot OH$  radicals, such as superoxide anions ( $O_2^{\cdot-}$ ), peroxide radicals ( $HO_2^{\cdot}$ ) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molecules. These reactive oxygen species (ROS) contribute to renew the radical attack mechanisms (Maness et al., 1999).

Some authors maintain that the addition of hydrogen peroxide to TiO<sub>2</sub> photocatalysis enhances the photodegradation of the existing pollutants because H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has the capacity to react directly with the electrons in the conduction band giving rise to hydroxyl radicals (Hartmann and Eisenstark, 1978). Moreover, the peroxide also directly adsorbs UV wavelengths and its peroxidic bond breaks, forming more oxidant radicals by itself (Mamane et al., 2007) and thus further improving the disinfection efficiency.

Many authors have investigated the mechanisms of photocatalysis bactericidal action since the first research carried out by Matsunaga and co-workers (1985). These studies have been recently reviewed (McCullagh et al., 2007). Most of these researches are been performed in distilled water or buffer solution. However, the matrix of the natural water has influence on the effectiveness of treatments on pathogens. Microorganisms can hide away from the radiation behind particles without being affected.

On the other hand, despite the intense existing literature, the system of photocatalytic disinfection is still not well understood. The fact of that polyunsaturated phospholipids are an integral component of the bacterial cellular membrane and they are susceptible to attack by ROS is well documented (Maness et al., 1999). The loss of the membrane structure and consequently its derived functions (semi permeability, respiration, oxidative phosphorylation reactions) are the main cause of cellular death. Cho et al. (2003) shows that there are different photocatalytic inactivation behaviours depending on the kind of microorganisms, based on the differences in the sizes and cellular surface structure.

*Escherichia coli* has been the most studied microorganism (Rodrigues et al., 2007; Rincón and Pulgarin, 2004; Rincón and Pulgarin, 2004; Rincón and Pulgarin, 2003; Rincón and Pulgarin, 2007; Gummy et al., 2006). However, only a few works have focused on other bacterial parameters which present greater resistance to disinfection treatments such as *Clostridium perfringens* (Dolin, 1959; Ando and Tsuzuki, 1986; Dunlop et al., 2008). European Directive 98/83/CE has included *C. perfringens* as a new microbiological parameter to check in systematic drinking water analysis because in adverse situations, it forms spores and survives in water for much longer than coliforms. Its presence in disinfected water can indicate that the treatment has been deficient and maybe other resistant pathogens will also have survived (Payment, 1999).

Therefore, in this work, the effectiveness of photolysis and TiO<sub>2</sub> photocatalysis and their combination with hydrogen peroxide has been compared for the inactivation of the anaerobic bacterium *C. perfringens* and its spores in natural water.

## 2. Methods

### 2.1. Sample preparation

The natural water studied in this research comes from the River Ebro (Zaragoza, Spain). The sampling was carried out 1 km away from the entrance point to the drinking water plant in the city of Zaragoza (Spain). The samples were conserved at  $-20$  °C. The water quality of the surface water is presented in Table 1.

Because the presence of *C. perfringens* in the natural samples was low (see Table 1), it was decided to increase this population artificially by the preparation of concentrated suspensions of vegetative cells and spores. Before mixing the water with the vegetative cell suspension or the spore suspension, the water sample was sterilized at 121 °C/15 min to remove any endogen microorganism.

#### 2.1.1. *C. perfringens* vegetative cells

A strain of *C. perfringens* of clinical origin was kindly supplied by the Microbiology Service of the Lozano Blesa Clinical University of Zaragoza (Spain). This strain was confirmed as *C. perfringens* after carrying out the following



Table 1  
Water quality obtained from Ebro River.

pH	Temperature (°C)	TOC (mg L <sup>-1</sup> )	Conductivity (μs cm <sup>-1</sup> )	Turbidity (NTU)	<i>C. perfringens</i> (CFU·100 mL <sup>-1</sup> )
7.83	20.8	3.2	1368	86	10 <sup>2</sup> –5 × 10 <sup>2</sup>

biochemical tests: sulphite reduction, lactose and glucose fermentation, motility, gelatine liquefaction, nitrate reduction and Gram stain. As described in previous works (Lanao et al., 2008), the preparation of the concentrated suspension involves the incubation from a stock culture of *C. perfringens* strain on Schaedler blood agar (Scharlab). After 24 h at 37 °C in anaerobic conditions, a cell suspension in sterile saline solution was prepared. This bacterial suspension was added to natural water to obtain a *C. perfringens* concentration ranging from 10<sup>7</sup>–10<sup>8</sup> CFU·100 mL<sup>-1</sup>.

#### 2.1.2. *C. perfringens* spores

The stock culture of *C. perfringens* was sub-cultured in thioglycollate broth at 37 °C for 24 h in anaerobic conditions. One millilitre of this thioglycollate culture was inoculated in sporulation broth according to the procedure described by Duncan and Strong (Duncan and Strong, 1968), and incubated at 37 °C for 72 h in anaerobic conditions. After the incubation, the spores were recovered by centrifugation (10,000 rpm, 15 min). The cultures were washed twice in peptone water 0.1%. After that, the spore suspension was heated at 80 °C/15 min to remove the vegetative cells. After three washes with peptone water 0.1%, the final spore suspension was obtained. The suspension of spores in natural water was prepared with a spore concentration of around 10<sup>3</sup> CFU·100 mL<sup>-1</sup>.

#### 2.2. Detection and enumeration of spores and vegetative cells

The culture and enumeration of *C. perfringens* (both vegetative cells and spores) was carried out according to the procedure ISO 6461-2:1984 (ISO 6461-2, 1986) using membrane filtration. Sterile cellulose membranes (Millipore) of 0.22 μm pore size and 47 mm diameter were used. After the addition of SPS agar (Scharlab), plates were incubated in anaerobic jars (Oxoid) at 44 °C. After 21 ± 3 h, black colonies appeared and the count was made. The variation coefficient of the analysis method was determined, resulting in a value of 7.7 %. This degree of error is applied to all results obtained in the experimentation.

From each sample taken during the experiment, various different volumes were filtered to ensure a reliable count in each sampling time and dilutions were made where necessary. The enumeration of the colonies was expressed as CFU (colony-forming units) per 100 mL of sample in each contact time. These concentrations were transformed to logarithmic units (log<sub>10</sub>) and the bacterial removal, Log ( $N_t/N_0$ ), was calculated from the initial population ( $N_0$ ) and the remaining population at time  $t$  ( $N_t$ ).

#### 2.3. Material and reagents

All glassware in contact with the sample was autoclaved at 121 °C for 15 min. All solutions and culture mediums were prepared with MilliQ<sup>®</sup> water and analytical-reagent-grade chemicals were used throughout.

The artificial solar illumination was performed with a solar chamber Atlas Suntest CPS+/XLS + located in the laboratory. This system enables reproduction in the laboratory of natural sunlight conditions with a xenon lamp and a filter made of window glass (Xenochrome 320) which cuts off wavelengths below 320 nm. The emission spectrum was in the range 320–800 nm. The solar chamber was equipped with a magnetic agitator (500 rpm) and a regulator of intensity and exposure time, as well as a temperature control.

The catalyst used in this study was treated TiO<sub>2</sub> obtained by thermal treatment of commercial TiO<sub>2</sub> (100% anatase, Panreac). Its spectrum XRD is shown in the Fig. 1 where it can be observed that anatase phase is the principal component of treated TiO<sub>2</sub>. As a result of the thermal treatment, the settling velocity of treated TiO<sub>2</sub> increases (0.4 m min<sup>-1</sup>) allowing its later removal by sedimentation. The thermal treatment consisted of heating the catalyst at 900 °C for 12 h. After cooling down until room temperature (23 °C), the TiO<sub>2</sub> was pressed, crushed and sieved to obtain a particle diameter of 500 μm. It was characterized by the BET method (Brunauer, Emmett and Teller). The specific area achieved was 6.43 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>.

#### 2.4. Operational conditions

In all the experiments, 1 L of water sample in a Schott Duran reaction vessel was placed inside the solar chamber. A magnetic stirrer provided an aerated environment and perfect mix of the sample, avoiding the settling of TiO<sub>2</sub> particles at the bottom of the reactor when this reactive was used. Previous experiments performed by this research group established reaction times of 5 min for vegetative cells and of 30 min for spores, carried out at room temperature (23 °C) and reaching a maximum of 29–30 °C during the irradiation. The intensity of the radiation selected for all experiments was 500 W m<sup>-2</sup>. Samples were taken at different times to perform the kinetic studies. Control assays were carried out with the lamp switched off using identical operational conditions.

The TiO<sub>2</sub> concentration was 1 g L<sup>-1</sup>. This dose has been used by other authors in disinfection treatments in water (Gumy et al., 2006; Ibarz et al., 2007). A concentration higher than 1 g L<sup>-1</sup> produces the saturation of the medium and consequently a lower degree of effectiveness in the

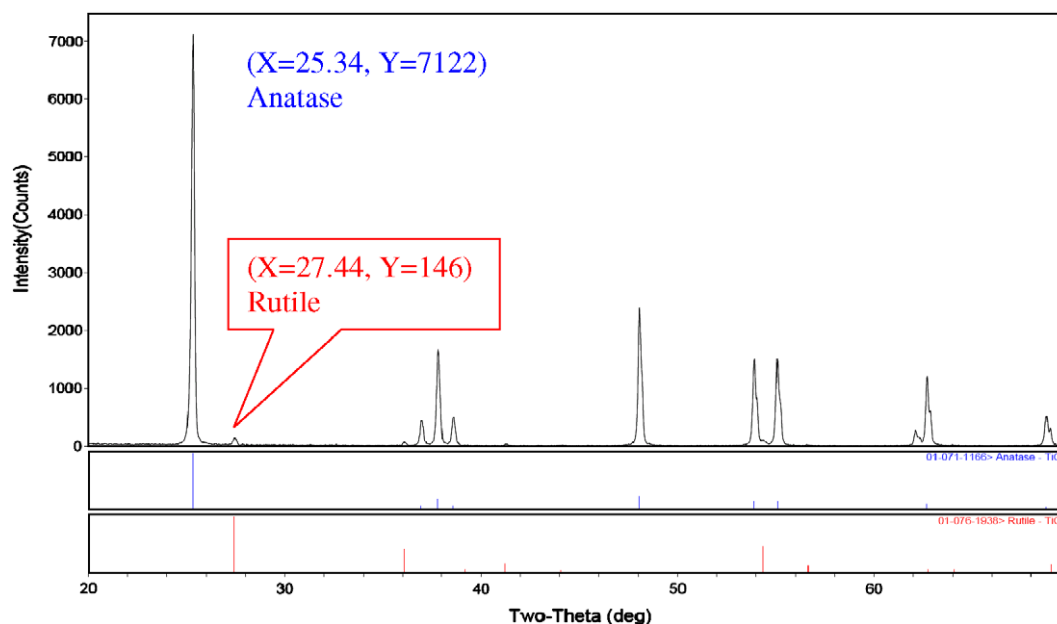


Fig. 1. Diffractogram of treated  $\text{TiO}_2$  anatase-rutile.

treatments due to the fact that light cannot easily penetrate into the water. Maness (Maness et al., 1999) reports in his photocatalytic research on *E. coli* that after working with different doses of  $\text{TiO}_2$  (0.1, 0.5 and  $1 \text{ g L}^{-1}$ ), the most effective concentration for eliminating *E. coli* is  $1 \text{ g L}^{-1}$  for populations between  $10^3$  and  $10^8 \text{ CFU mL}^{-1}$ .

To study the effect of the  $\text{H}_2\text{O}_2$  on the disinfection of *C. perfringens*, experiments with  $0.04 \text{ mM H}_2\text{O}_2$  (Carlo Erba, quality for analysis) were performed. The residual  $\text{H}_2\text{O}_2$  was quenched with sodium thiosulphate (Panreac) to cut its bactericidal effect.

### 3. Results and discussion

In Fig. 2, the bactericidal capacity of light,  $\text{TiO}_2$  and light/ $\text{TiO}_2$  treatments is shown on vegetative cells of *C. perfringens*. The inactivation in logarithmic units is repre-

sented vs. the length in time of treatment. It is observed how the titanium dioxide, without being activated by the light, does not exert any bactericidal action. With the photocatalytic treatment, a reduced level of inactivation is observed, obtaining 1.2 log units of inactivation after 5 min of treatment. However, when  $\text{TiO}_2$  is irradiated with light, an inactivation of vegetative cells of 6 log units is effectively achieved. This photocatalysis treatment represents an improvement in the disinfection compared to photolysis under the conditions studied.

Spores have a greater resistance to the  $\text{TiO}_2$ , light and light/ $\text{TiO}_2$  treatment. As can be seen in Fig. 3, light removes practically no spores, even after 30 min of treatment ( $<0.2 \text{ log}$ ). The synergistic effect of light and  $\text{TiO}_2$  is capable of eliminating spores, but only 1.3 log at the end of the treatment, after 30 min of irradiation. At 5 min, the removal is lower than 1 log unit, a value much inferior

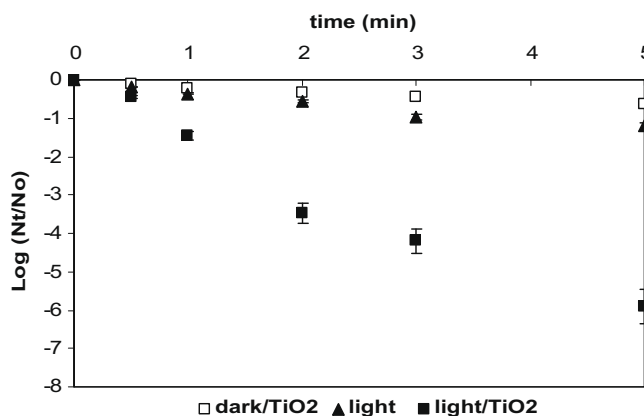


Fig. 2. Elimination of vegetative cells of *C. perfringens* by treatments of  $\text{TiO}_2$ , light and light/ $\text{TiO}_2$ . Light intensity:  $500 \text{ W m}^{-2}$ .  $\text{TiO}_2$ :  $1 \text{ g L}^{-1}$ .

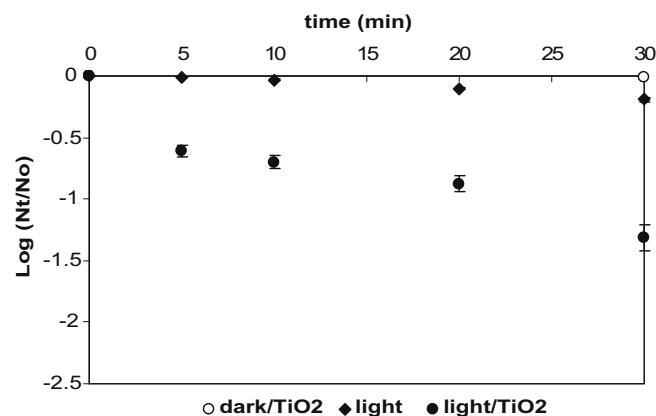


Fig. 3. Elimination of *C. perfringens* spores by  $\text{TiO}_2$ , light and light/ $\text{TiO}_2$  treatments. Light intensity:  $500 \text{ W m}^{-2}$ .  $\text{TiO}_2$ :  $1 \text{ g L}^{-1}$ .

to the value detected in the removal of vegetative cells under the same conditions.

Fig. 4 shows the bactericidal effect that a dose of 0.04 mM of  $H_2O_2$  combined with light has on a population of vegetative cells of *C. perfringens*. The  $H_2O_2$  by itself has a low bactericidal effect, the same as light by itself, as Fig. 2 shows. However, the combination of both agents increases the disinfectant capacity of the treatment until reaching inactivation values near to 8.5 log units. Better results are obtained with peroxide due to its radical contribution when it is irradiated with light.

As can be observed in Fig. 5 and as occurs with the vegetative cells, the dose of 0.04 mM of  $H_2O_2$  by itself has a low bactericidal capacity on spores. It is observed that this concentration of peroxide achieves an inactivation lower than 0.5 log at 5 min and 1 log unit at 30 min. However, when the sample is irradiated with light, the  $H_2O_2$  is activated and the disinfectant capacity of the treatment increases over that with light by itself (see Fig. 3 and Fig. 5). As we can observe, inactivation is achieved during the first 5–10 min of treatment. Later, the spore population remains practically stable during the treatment until

30 min, achieving a final inactivation of 1.13 log, in spite of there being a residual concentration of  $H_2O_2$  of 0.5–2 mg  $L^{-1}$ . It seems that spores die after the first minutes of attack and subsequently adapt to resist the aggression.

Fig. 6 shows the inactivation capacity of the  $H_2O_2/TiO_2$  and light/ $H_2O_2/TiO_2$  treatments on the *C. perfringens* vegetative cells. The combination of  $H_2O_2$  with  $TiO_2$ , without the presence of light, has practically no effect in the reduction of colony-forming units, with a removal lower than 0.5 log. However, when light is added to the process (light/ $H_2O_2/TiO_2$ ) the disinfectant capacity increases in great measure until reaching a removal level of 7 log units. This result is very similar to that obtained with the light/ $H_2O_2$  treatment and slightly superior to the result obtained with the light/ $TiO_2$  system. Consequently, in this treatment there is no interaction between the  $TiO_2$  and the  $H_2O_2$  in the production of oxidant radicals which cause the mortality of the bacteria studied. The application of the light/ $TiO_2/H_2O_2$  treatment does not increase the level of inactivation with respect to the level obtained by the light/ $TiO_2$  and light/ $H_2O_2$  systems. This result contrasts with the study carried out by Hartmann and Eisenstark (1978) which establishes that the addition of hydrogen peroxide to  $TiO_2$  photocatalysis enhances the photodegradation of the pollutants. In our study, there is not interaction between  $TiO_2$  and  $H_2O_2$ .

Finally, Fig. 7 shows the inactivation capacity of the  $H_2O_2/TiO_2$  and light/ $H_2O_2/TiO_2$  treatments on the spores of *C. perfringens*. The combination of  $H_2O_2/TiO_2$  without the presence of light has a slight disinfectant effect on spores (0.5 log). The curve of inactivation of spores with the light/ $H_2O_2/TiO_2$  treatment is very similar to that observed in Fig. 5 with the light/ $H_2O_2$  treatment. An order of inactivation of 1 log is obtained with the light/ $H_2O_2/TiO_2$  system compared to 1.1 log with the light/ $H_2O_2$  treatment at 30 min, indicating that the addition of  $TiO_2$  does not improve the disinfection in this case either. Thus it is again observed that there is no interaction phenomenon between  $TiO_2$  and  $H_2O_2$ .

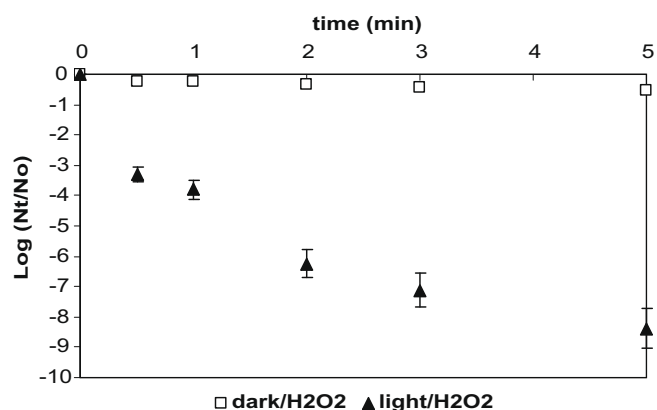


Fig. 4. Bactericidal effect of  $H_2O_2$  and light/ $H_2O_2$  treatment on vegetative cells of *C. perfringens*. Light intensity: 500  $W m^{-2}$ .  $H_2O_2$ : 0.04 mM.

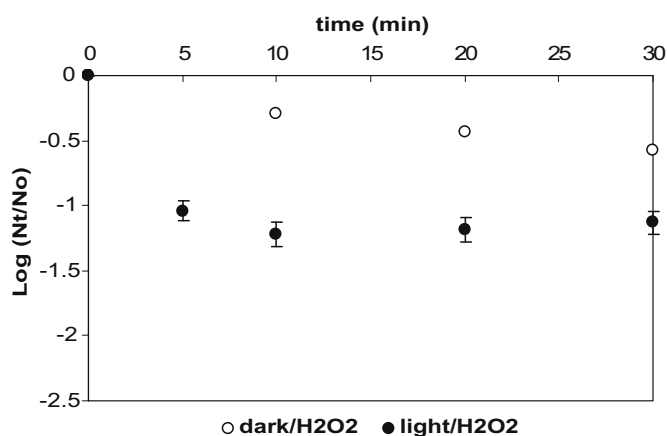


Fig. 5. Bactericidal effect of  $H_2O_2$  and light/ $H_2O_2$  treatment on *C. perfringens* spores. Light intensity: 500  $W m^{-2}$ .  $H_2O_2$ : 0.04 mM.

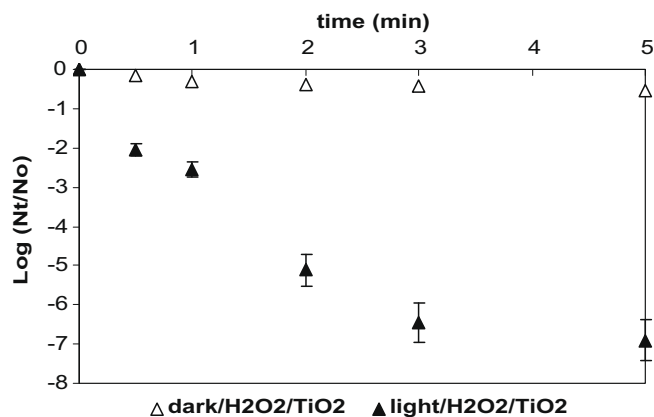


Fig. 6. Bactericidal effect of  $H_2O_2/TiO_2$  and light/ $H_2O_2/TiO_2$  treatments on vegetative cells of *C. perfringens*. Light intensity: 500  $W m^{-2}$ .  $H_2O_2$ : 0.04 mM.  $TiO_2$ : 1 g  $L^{-1}$ .

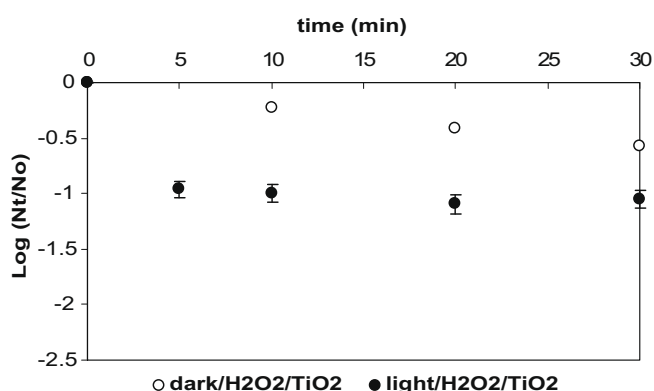


Fig. 7. Bactericidal effect of  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$  and light/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$  treatments on *C. perfringens* spores. Light intensity:  $500 \text{ W m}^{-2}$ .  $\text{H}_2\text{O}_2$ :  $0.04 \text{ mM}$ .  $\text{TiO}_2$ :  $1 \text{ g L}^{-1}$ .

So, it is clear that light by itself, under the operational conditions, has a poor disinfectant effect both on vegetative cells and on spores of *C. perfringens*. When  $\text{TiO}_2$  and light act together, an essential improvement in the disinfection is observed on the vegetative cells and spores because when  $\text{TiO}_2$  is irradiated with wavelengths less than  $385 \text{ nm}$ , it generates on its surface precursors of OH radicals leading to an improvement in the disinfectant activity.

Rincón and Pulgarin (2003) emphasizes that during the first minutes of the photolytic treatment, the self-defence mechanisms of cells get to work, trying to thwart the direct effect of the light. Thus during the first minutes, the bacterial inactivation is weak until, if the stress agent persists, these mechanisms cease to be effective. However, when the catalyst takes part in the process, the bactericidal activity is reinforced with the appearance of very reactive oxidant species, ROS, exceeding the protection mechanisms of the cells. Dunlop et al. (2008) underlines higher initial cells loading leads to higher treatment times for a complete inactivation.

Another reagent whose addition improves the activity of the sunlight by itself is hydrogen peroxide. Just as  $\text{TiO}_2$  in the dark does not have any disinfectant effect (Figs. 2 and 3), the  $\text{H}_2\text{O}_2$  has a slow effect by itself (Figs. 4 and 5). Therefore, in the light/ $\text{H}_2\text{O}_2$  treatment both on vegetative cells and on spores, the union of the direct oxidative and disinfectant effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  is evident, as well as the direct action of the light on bacteria and the break-up of hydrogen peroxide under short wavelengths, generating an important quantity of  $\cdot\text{OH}$  radicals as by-products. Rincón and Pulgarin (2004) establishes in his photocatalytic studies about *E. coli* that the direct action of  $\text{H}_2\text{O}_2$  weakens the bacteria, making them more sensitive to the photocatalytic effect. This is in addition to the fact that irradiation also debilitates the bacteria, making them more sensitive to the  $\text{H}_2\text{O}_2$  attack. Hartmann and Eisenstark (1978) reported a synergistic killing of *E. coli* by near-UV radiation ( $300\text{--}400 \text{ nm}$ ) and small quantities of  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0.006\text{--}0.6 \text{ mM}$ ).

The results of inactivation obtained with the light/ $\text{TiO}_2$  and light/ $\text{H}_2\text{O}_2$  treatments are quite similar for both the

cellular forms of *C. perfringens* under study. However, when light,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{TiO}_2$  are combined, the results are not significantly different to the previous ones, so this combination did not play an important role in the disinfection process. There is no synergy between the peroxide and the  $\text{TiO}_2$  catalyst because a superior result to the sum of the results of light/ $\text{TiO}_2$  and light/ $\text{H}_2\text{O}_2$  is not obtained. Thus the light/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{TiO}_2$  treatment does not contribute any improvement to the disinfection compared to the light/ $\text{TiO}_2$  and light/ $\text{H}_2\text{O}_2$  systems.

In spore treatments it is observed, as expected, that spores are more resistant to the aggression than the vegetative cells. Works of Dunlop et al. (2008) and Lonnen et al. (2005) show the same behaviour: bacterial spores show a greater resistance to treatment than vegetative bacterial cells. Furthermore, spores are able to resist in spite of a residual concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  remaining throughout the treatment. It is also observed with spores that there is no interaction between the  $\text{TiO}_2$  and the  $\text{H}_2\text{O}_2$  to contribute to an improvement in the effectiveness of the process.

#### 4. Conclusions

Advanced disinfection systems with light,  $\text{TiO}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  were studied to compare their effectiveness on the inactivation of *C. perfringens* spores and vegetative cells. Spores show a greater resistance to all treatments than vegetative bacterial cells, so it is confirmed that *C. perfringens* spores are better indicators of the effectiveness of water treatments due to their strong resistance to the treatments carried out in this study.

Both  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{TiO}_2$  produces a reinforcement in the synthesis of new  $\cdot\text{OH}$  radicals which act effectively on bacterial cells and spores. However, not as we expected, when light,  $\text{TiO}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  work together, worst results are obtained. There is no interaction between  $\text{TiO}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

#### Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Javier Yangüela (University of Zaragoza) and Susana Gimeno for their help in the development of this work. This work was supported by the project CTM2005-04585/TECNO funded by the “Secretaría de Estado de Universidad e Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia” and the project CTM2008-01876/TECNO cofunded by the “Secretaría de Estado de Universidad e Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia and the “Gobierno de Aragón” (official announcement CAIXA-DGA).

#### References

- OECD, Executive Summary of the Basingstoke 2000 Expert Group Meeting on Approaches for Establishing Links between Drinking Water and Infectious Diseases, 2000.
- Rodrigues, C.P., Zioli, R.L., Guimarães, J.R., 2007. Inactivation of *E. coli* in water by  $\text{TiO}_2$ -assisted disinfection using solar light. J. Braz. Chem. Soc. 18, 126–134.

- Boorman, G.A., Dellarco, V., Dunnick, J.K., Chapin, R.E., Hunter, S., Hauchman, F., Gardner, H., Cox, M., Sills, R.C., 1999. Drinking water disinfection byproducts: review and approach to toxicity evaluation. *Environ. Health Perspect.* 107, 207–217.
- Environmental Protection Agency. Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual, EPA 815-R-99-014, 1999, pp. 2–27.
- McGuigan, K.G., Joyce, T.M., Conroy, R.M., Gillespie, J.B., Elmore-Meegan, M., 1998. Solar disinfection of drinking water contained in transparent plastic bottles: characterizing the bacterial inactivation process. *J. Appl. Microbiol.* 84, 1138–1148.
- Robertson, J.M.C., Robertson, P.K.J., Lawton, L.A., 2005. A comparison of the effectiveness of TiO<sub>2</sub> photocatalysis and UVA photolysis for the destruction of three pathogenic micro-organisms. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 175, 51–56.
- Rincón, A.G., Pulgarin, C., 2004. Effect of pH, inorganic ions, organic matter and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on *E. coli* K12 photocatalytic inactivation by TiO<sub>2</sub>. Implications in solar water disinfection. *Appl. Catal. B Environ.* 51, 283–302.
- Maness, P., Smolinski, S., Blake, D.M., Huang, Z., Wolfrum, E., Jacoby, W.A., 1999. Bactericidal activity of photocatalytic TiO<sub>2</sub> reaction: toward an understanding of its killing mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4094–4098.
- Rincón, A.G., Pulgarin, C., 2004. Field solar *E. coli* inactivation in the absence and presence of TiO<sub>2</sub>: is UV solar dose an appropriate parameter for standardization of water solar disinfection? *Sol. Energy* 77, 635–648.
- Rincón, A.G., Pulgarin, C., 2003. Photocatalytic inactivation of *E. coli*: effect of (continuous–intermittent) light intensity and of (suspended–fixed) TiO<sub>2</sub> concentration. *Appl. Catal. B Environ.* 44, 263–284.
- Hartmann, P.S., Eisenstark, A., 1978. Synergistic killing of *Escherichia coli* by near-UV radiation and hydrogen peroxide: distinction between RecA-repairable and RecA-nonrepairable damage. *J. Bacteriol.* 133, 769–774.
- Mamane, H., Shemer, H., Linden, K.G., 2007. Inactivation of *E. coli*, *B. subtilis* spores and MS2, T4 and T7 phage using UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> advanced oxidation. *J. Hazard. Mater.* 146, 479–486.
- Matsunaga, T., Tomodam, T., Nakajima, T., Wake, H., 1985. Photochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders. *FEMS Microbiol. Lett.* 29, 211–214.
- McCullagh, C., Robertson, J.M.C., Bahnemann, D.W., Robertson, P.K.J., 2007. The application of TiO<sub>2</sub> photocatalysis for disinfection of water contaminated with pathogenic micro-organisms: a review. *Res. Chem. Intermed.* 33, 359–375.
- Cho, M., Chung, H., Yoon, J., 2003. Disinfection of water containing natural organic matter by using ozone-initiated radical reactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2284–2291.
- Rincón, A.G., Pulgarin, C., 2007. Solar photolytic and photocatalytic disinfection of water at laboratory and field scale. Effect of the chemical composition of water and study of the postirradiation events. *J. Sol. Energy Eng.* 129, 100–110.
- Gumy, D., Rincón, A.G., Hajdu, R., Pulgarin, C., 2006. Solar photocatalysis for detoxification and disinfection of water: different types of suspended and fixed TiO<sub>2</sub> catalysts study. *Sol. Energy* 80, 1376–1381.
- Dolin, M.I., 1959. Oxidation of reduced diphosphopyridine nucleotide by *Clostridium perfringens*. I. Relation of peroxide to the over-all reaction. *J. Bacteriol.* 77, 383–392.
- Ando, Y., Tsuzuki, T., 1986. The effect of hydrogen peroxide on spores of *Clostridium perfringens*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2, 65–68.
- Dunlop, P.S.M., McMurray, T.A., Hamilton, J.W.J., Byrne, J.A., 2008. Photocatalytic inactivation of *Clostridium perfringens* spores on TiO<sub>2</sub> electrodes. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 196, 113–119.
- Payment, P., 1999. Poor efficacy of residual chlorine disinfectant in drinking water to inactivate waterborne pathogens in distribution systems. *Can. J. Microbiol.* 45, 709–715.
- Lanao, M., Ormad, M.P., Ibarz, C., Miguel, N., Ovelleiro, J.L., 2008. Bactericidal Effectiveness of O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> on *Clostridium perfringens*. *Ozone: Sci. Eng.* 30, 431–438.
- Duncan, C.L., Strong, D.H., 1968. Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.* 16, 82–89.
- ISO 6461-2. Water quality – detection and enumeration of the spores of sulphite-reducing anaerobes (clostridia). Part 2. Method by membrane filtration. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 1986.
- Ibarz, C., Lanao, M., Miguel, N., Ormad, M.P., Ovelleiro, J.L., 2007. *Enterococcus* sp. Inactivation in Natural Water by TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Photocatalysis. Proceedings of the 2007 World Congress on Ozone and Ultraviolet Technologies. International Ozone Association and International Ultraviolet Association. Los Angeles, California, USA.
- Lonnen, J., Kilvington, S., Kehoe, S.C., Al-Touati, F., McGuigan, K.G., 2005. Solar and photocatalytic disinfection of protozoan, fungal and bacterial microbes in drinking water. *Water Res.* 39, 877–883.





# Inactivation of *Enterococcus* sp. by photolysis and TiO<sub>2</sub> photocatalysis with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in natural water

M. Lanao<sup>\*</sup>, M.P. Ormad, R. Mosteo, J.L. Ovelleiro

Department of Chemical Engineering and Environmental Technologies, Science Faculty, University of Zaragoza,  
12 Pedro Cerbuna Street, Zaragoza 50009, Spain

Received 24 July 2011; received in revised form 19 October 2011; accepted 9 November 2011  
Available online 6 December 2011

Communicated by: Associate Editor Gion Calzaferri

## Abstract

This paper presents research carried out into the disinfectant power of a series of treatments based on the individual application and possible combinations of TiO<sub>2</sub> (1 g/L), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.04 mM) and irradiation (290–800 nm and 320–800 nm) on *Enterococcus* sp., a faecal bacterial indicator used in water analysis. The main aims are the determination of the influence of the UVB range on the inactivation of *Enterococcus* sp. in natural water, the mode of application of irradiation (intermittent or continuous) and the capacity of bacterial recovery after the application of the treatments in darkness conditions. The results show that when the irradiation includes the UVB range, a very high degree of inactivation is obtained in an *Enterococcus* sp. solution in natural water ( $N_0 = 10^8$  CFU 100 mL<sup>-1</sup>) by irradiation alone. Neither the addition of TiO<sub>2</sub> nor of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are very relevant in these conditions. However, if the irradiation does not include the UVB range, the bactericidal action of photolysis is practically nonexistent, highlighting the positive effect of TiO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the irradiation, the photocatalysis and photocatalysis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments obtaining a higher degree of disinfection. Continuous and intermittent illumination give rise to similar inactivation levels in all the treatments studied, except for photolysis in which a significant increase in inactivation is observed when the irradiation is continuous. During 3 h of darkness following application of the treatments, there is no change or else a slight recovery of the bacterial population.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** *Enterococcus*; Hydrogen peroxide; Water disinfection; Photolysis; Photocatalysis

## 1. Introduction

In general, one of the main purposes of treating water for drinking or for reuse is disinfection, that is the elimination of pathogenic microorganisms. Chlorination has traditionally been the most extensively used technology with this aim, but since the harmful character was discovered of organochlorated by-products after the application of chlorine in water treatments, the scientific literature has

concentrated on finding alternative processes to achieve the disinfection of water and the removal of pollutants without the generation of these by-products (Blake et al., 1999; Chong et al., 2010). Possible treatments for future application include the use of ozone, the Fenton process, the photo-Fenton process and photolysis, all of them susceptible to being combined with other elements to improve their performance, such as hydrogen peroxide, metallic cations and other catalysts. These new treatments, generally called Advanced Oxidation Processes (AOPs) are based on the generation of highly reactive temporary species with a short life. These species, known as reactive oxygen species (ROS), are able to remove a high proportion of pathogenic microorganisms present in waters and to degrade

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel.: +34 976761877; fax: +34 976764221.

E-mail addresses: [mlanao@unizar.es](mailto:mlanao@unizar.es) (M. Lanao), [mpormad@unizar.es](mailto:mpormad@unizar.es) (M.P. Ormad), [mosteo@unizar.es](mailto:mosteo@unizar.es) (R. Mosteo), [oveleiro@unizar.es](mailto:oveleiro@unizar.es) (J.L. Ovelleiro).

organic compounds into simple products or products more easily oxidisable by other stages of the treatment (Maness et al., 1999; Peyton and Glaze, 1988).

Among the various AOPs, photocatalytic water treatment technology is an alternative that could be applied in the near future. Many research works guarantee its effectiveness in the removal of highly persistent compounds in water such as pesticides used in agriculture (Ormad et al., 2010), antibiotics and other medicines (Elmolla and Chaudhuri, 2009, 2010), and microorganisms present in water (Chong et al., 2010). Currently, the most extensively studied semiconductor catalyst is titanium dioxide owing to its characteristics of photoactivity, stability and harmlessness.

The effectiveness of this technology lies in the triggering of a group of oxidation and reduction reactions at the  $\text{TiO}_2$  surface when activated under certain wavelengths of the solar spectrum ( $\lambda < 385 \text{ nm}$ ). As consequence of the activation of the catalyst, dual electron–hole structures are generated on its surface from which redox reactions are initiated and ROS are generated, in particular  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{HO}_2^\cdot$ ,  $\text{OH}^\cdot$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  species. These species are capable of producing oxidative stress on the microorganisms, although the external cell wall, composed of peptidoglycans, constitutes the first obstacle to slowing down any type of attack. Once this defence is overcome, the ROS radicals will attack the plasmatic membrane, composed of phospholipids and integral proteins, until they reach the bacterial cytoplasm and release the intracellular contents, upsetting the balance of the vital functions and the death of the bacterium (Huang et al., 2000; Maness et al., 1999).

As well as the titanium dioxide and UV range which activate the catalyst, other auxiliary oxidants can be added to photocatalytic treatments, to improve the effectiveness of the process. These include hydrogen peroxide or sodium peroxydisulphate ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) (Kositz et al., 2004; Rincón and Pulgarin, 2004a). In this case, it is not only the oxygen that acts as an electron acceptor in the redox reactions generated on the catalyst. The  $\text{H}_2\text{O}_2$  also participates in the process, avoiding the recombination of electrons with the holes created in the  $\text{TiO}_2$  surface which would lead to inferior disinfection results. However, if there is an excess of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , it can also act as an OH radical scavenger or form peroxo-compounds on the  $\text{TiO}_2$  surface, thus prejudicing the photocatalytic process (Kositz et al., 2004).

The UV light which activates  $\text{TiO}_2$  represents a small fraction of the solar spectrum, so many photocatalytic studies use solar radiation as a UV source so that it becomes a resource of easier access. In the solar spectrum, the components which can affect the viability of microor-

ganisms are UVB, UVA and visible ranges. UVB directly affects the genetic material of the cell, while UVA and the visible range participate in the activation of agents such as catalysts and oxidants, influencing the ROS generation (Rincón and Pulgarin, 2004b). At present, pilot plants are being designed with the aim of applying photolytic and photocatalytic treatments on a real scale in the near future, either as a stage within a series of water treatments or as a single stage of water processing (Blanco et al., 2009; Chong et al., 2010; Malato et al., 2001). In both cases, the catalyst recovery is an important economic consideration. Numerous research studies in the disinfection field have been carried out with immobilised  $\text{TiO}_2$  supports on *Escherichia coli* populations or else with  $\text{TiO}_2$  in suspension, with good results in diverse study conditions (Alrousan et al., 2009; Gummy et al., 2006; Rincón and Pulgarin, 2003).

*E. coli* is one of the most extensively studied faecal pollution indicators in disinfection research (Benabbou et al., 2007; Rincón and Pulgarin, 2003, 2004a,b, 2007). This study is focused on *Enterococcus* sp., another indicator which has a higher survival rate in the aquatic medium and is more resistant in dry and disinfectant conditions than *E. coli*. The aims are as follows:

1. To research the disinfectant power of irradiation (290–800 nm and 320–800 nm) in the presence and absence of  $\text{TiO}_2$  and/or  $\text{H}_2\text{O}_2$  on a natural water sample fortified with *Enterococcus* sp.
2. To determine the influence of the UVB range on *Enterococcus* sp. inactivation.
3. To analyse the influence of the mode of application of irradiation (intermittent or continuous) on the bacterium in all of the treatments studied.
4. To evaluate the capacity of bacterial recovery after the application of the treatments in darkness conditions (for 3 h).

## 2. Methods

### 2.1. Sample preparation

All treatments conducted in this study have been carried out with natural water from the Ebro River, collected at a point previous to the entrance of the drinking water treatment plant in Zaragoza (Spain). A sample of 25 L was distributed in ISO collection bottles with a volume of 1 L. Samples were conserved at  $-20^\circ\text{C}$  for a perfect support. The quality of the surface water is shown in Table 1.

Table 1  
Water quality obtained from Ebro River.

pH	$T^a$ ( $^\circ\text{C}$ )	TOC ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Conductivity ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	Turbidity (NTU)	<i>Enterococcus</i> sp. (CFU 100 $\text{mL}^{-1}$ )
8.16	22	3.3	550	144	$1-5 \times 10^2$

Natural water from the Ebro River has a low concentration of *Enterococcus* sp. (see Table 1), hindering the effective evaluation of treatments. For this reason, the bacterial population was artificially increased using an *Enterococcus* sp. strain isolated from the same river and confirmed by biochemical tests. The preparation of the concentrated suspension involved incubation from a stock culture of *Enterococcus* sp. on nutritive agar (Scharlab). After 48 h at 37 °C in aerobic conditions, a cell suspension in sterile saline solution was prepared. Before the irradiation inactivation experiments were carried out, the water sample was sterilized at 121 °C/15 min to remove any endogen microorganism. Natural water was then inoculated with this bacterial suspension to give an approximate final concentration of  $10^8$  CFU 100 mL<sup>-1</sup>.

## 2.2. Enumeration of *Enterococcus* sp.

The culture and enumeration of *Enterococcus* sp. was carried out according to the procedure set out in ISO 7899-2:2000. Measured volumes from each sampling point were filtered through a sterilized 0.45 µm-pore size cellulose nitrate membrane (Millipore) using a membrane filtration apparatus. Cultured *Enterococcus* sp. organisms were detected by incubation after 48 h at 37 °C using Slanetz & Bartley agar (Scharlab) as the selective medium. After this period, the colonies with a pink–purple colour were counted and some of them submitted to confirmation tests by Gram stain.

From each sample taken in the experiments, several different volumes were filtered to ensure a reliable count in each sampling time. Dilutions were made where necessary. The enumeration of colonies was carried out in terms of colony-forming units (CFUs) per 100 mL of sample in each contact time. These concentrations were transformed to log<sub>10</sub> and the killing efficiency determined by log ( $N_t/N_0$ ) where  $N_0$  and  $N_t$  are the *Enterococcus* sp. before and after disinfection. All zero counts were replaced by the lowest possible count. Replicates of the experiments were performed and a medium value was calculated for each sampling point.

## 2.3. Material, reagents and instrumentation

All the glassware used was autoclaved at 121 °C for 15 min to ensure it was sterile, an indispensable condition in microbiological research. All the solutions and culture mediums were prepared with MilliQ® water and analytical-reagent-grade chemicals were used throughout.

The irradiation was performed with an Atlas Suntest CPS+/XLS+ solar chamber located in the laboratory with a xenon lamp which light intensity ranges from 250 to 765 W m<sup>-2</sup>. This system enables reproduction in the laboratory of natural sunlight conditions with a quartz filter (290–800 nm) and an additional filter made of window glass (Xenochrome 320) which cuts off wavelengths below 320 nm, removing the UVB range. The solar chamber was

equipped with a magnetic agitator (500 rpm) and a regulator of intensity and exposure time, as well as a temperature control.

In the photocatalytic experiments, the catalyst used in this study was treated TiO<sub>2</sub> obtained from commercial TiO<sub>2</sub> (100% anatase, Panreac). The commercial TiO<sub>2</sub> was transformed by thermal treatment into a mixture of 20% rutile – 80% anatase with a particle size of 500 µm, described in detail in previous works (Lanao et al., 2010). This is applied in dissolution but after use it can be eliminated by sedimentation (Fernández-Ibáñez et al., 2003; Ljubas, 2005; Miguel, 2010).

The solution of hydrogen peroxide used was prepared from a concentrated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution at 30% by weight (Carlo Erba, quality for analysis).

## 2.4. Operational conditions

In all the experiments, 1 L of water sample in a Schott reaction vessel was placed inside the solar chamber. An aired environment and a perfect mix were provided by a magnetic stirrer, avoiding the settling of TiO<sub>2</sub> particles at the bottom of the reactor when this reactive was used. The same experiments were carried out with and without a window filter. With the window filter, the range of irradiation emitted covered wavelengths between 320 and 800 nm. Without the filter, the range was extended from 290 to 800 nm. The intensity of the irradiation selected for all experiments was 500 W m<sup>-2</sup>.

The maximum irradiation time was 30 min for all experiments. Samples were taken at different times. After the radiation period, the suspension was kept in darkness for 180 min with the aim of assessing the capacity of the damaged population to recover. The temperature of the samples did not exceed 31 °C at the end of the process. Control assays were carried out with the lamp switched off using identical operational conditions.

The dose of TiO<sub>2</sub> added in this study was 1 g L<sup>-1</sup> and the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration utilised was 0.04 mM. The TiO<sub>2</sub> dose had previously been selected by other researchers (Cho et al., 2004; Miguel et al., 2010; Rincón and Pulgarin, 2003). The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dose had also been used in previous works in which it was established that it showed hardly any inactivation by itself at such a concentration. Its effect can thus be studied when it is added to solar radiation or to TiO<sub>2</sub> (Lanao et al., 2008, 2010). At the end of the experiments, the residual H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was quenched with sodium thiosulphate (Panreac) to cut its bactericidal effect.

## 2.5. Statistical analyses

From the results of inactivation obtained in the microbiological analysis of the samples treated with advanced oxidation treatments, a statistical study was carried out using the software GraphPad Prism® (version 4.03). A one-way ANOVA analysis using the Bonferroni test was applied to determine whether or not significant differences existed between the different treatments studied. A significance level



of 95% was used in all the statistical analyses. When the “ $p$ ” ( $p$ -value) is higher than the significance level ( $p > 0.05$ ), the difference between the treatments compared is not considered significant while if the “ $p$ ” is lower than the significance level, the difference between the treatments is considered significant ( $p < 0.05$ ) or highly significant ( $p < 0.01$ ).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Treatments with UVA and visible radiation ( $\lambda = 320$ – $800$ nm)

Fig. 1 shows the inactivation curves of *Enterococcus* sp. during the photolysis, photolysis/ $H_2O_2$ , photocatalysis and photocatalysis/ $H_2O_2$  processes, with a microbiological count every 5 min. In addition, by way of reference some experiments were carried out with only  $H_2O_2$ ,  $TiO_2$  or  $TiO_2/H_2O_2$  on *Enterococcus* sp. populations. It was noted that these reagents when used individually do not show any disinfection power under the operational conditions used.

In the Fig. 1 it can be verified that the application of irradiation by itself on the sample, photolysis, has practically no any effect on *Enterococcus* sp., achieving a disinfection of 0.3 logarithmic units after 30 min of treatment.

It is well known that the addition of photoactive substances such as hydrogen peroxide and certain catalysts provides conditions in the medium under which the levels of inactivation are higher. When titanium dioxide is combined with solar radiation, photocatalysis, an activation of the catalyst is produced, promoting its bactericidal action. In Fig. 1, a final logarithmic reduction of 2.3 units is observed with this treatment, showing highly significant differences ( $p < 0.01$ ) with regard to the photolysis.

After adding the  $H_2O_2$  dose of 0.04 mM to the sample and combining it with irradiation, hardly any bacterial inactivation was observed, the maximum being 0.4 units

log at 30 min. No significant difference was noticed between photolysis/ $H_2O_2$  and photolysis ( $p > 0.05$ ). So, the poor disinfectant ability of photolysis/ $H_2O_2$  is observed in this experiment. This result seems logical given the basis of the  $H_2O_2$  breakdown, which is produced under wavelengths  $< 320$  nm and as a consequence outside the radiation range used in these experiments. However, on sporulated structures of *Clostridium perfringens*, the photolysis/ $H_2O_2$  treatment reached significantly higher levels of inactivation compared to the photolysis (Lanao et al., 2010). It is a well known fact that microorganisms actively respond to alterations in the medium until the stress produced reaches high levels. The responses to these attacks are self-defence mechanisms developed by bacteria; these mechanisms allow them to thwart the attack for a variable period of time depending on the aggressiveness of the attack (Hoerter et al., 2005). It is therefore possible that the conditions of the matrix in photolysis combined with  $H_2O_2$  are not very aggressive for *Enterococcus* sp. and it is capable of maintaining its defensive mechanisms during this time. The radical ROS, when they reach a certain concentration, manage to destabilize the defensive arts of the cell and to alter its functionality. Some authors have established that after the release of iron ions (II and III) into the medium, hitherto retained inside the bacteria, photo-Fenton reactions take place at the same time and accelerate the process of cellular death begun by the oxidative radical species (Benabbou et al., 2007).

The last treatment represented in Fig. 1 corresponds to the photocatalysis/ $H_2O_2$  process. This manages to reduce the initial populations of *Enterococcus* sp. by 1.9 logarithmic units, with a similar tendency to that of photocatalysis. Photocatalysis/ $H_2O_2$  improves in a significant way ( $p < 0.05$ ) the disinfectant capacity obtained with the photolysis and photolysis/ $H_2O_2$  processes. On the other hand, in the Fig. 1 the photocatalysis/ $H_2O_2$  remains slightly below the photocatalytic treatment and analysing the results in statistical terms, this difference is not significant ( $p > 0.05$ ). It is possible that the molecules of hydrogen peroxide present in the aqueous colloidal suspension have filled spaces in the  $TiO_2$  surface and thus the effectiveness of the treatment is less than that of the photocatalytic treatment. Hartmann and Eisenstark (1978) established that the addition of hydrogen peroxide (with doses between 0.6 and 0.006 mM) to  $TiO_2$  photocatalysis enhanced the photodegradation of an *E. coli* population. However, the same does not occur in the case of *Enterococcus*, just as this study shows. The same response was also observed on cells and spores of *C. perfringens* under the same experimental conditions (Lanao et al., 2010). One explanation could be the low dose used in the experiments, unable to generate enough oxidative stress on *Enterococcus* sp. If, on the other hand, the addition of peroxide to photocatalysis generates a high concentration of active radicals, Kositz et al. (2004) established that the peroxide, in presence of light, can participate as an OH radicals scavenger, forming hydroperoxide radicals,  $HO_2\cdot$ , or generating peroxo-compounds on the  $TiO_2$  surface, damaging the activity of

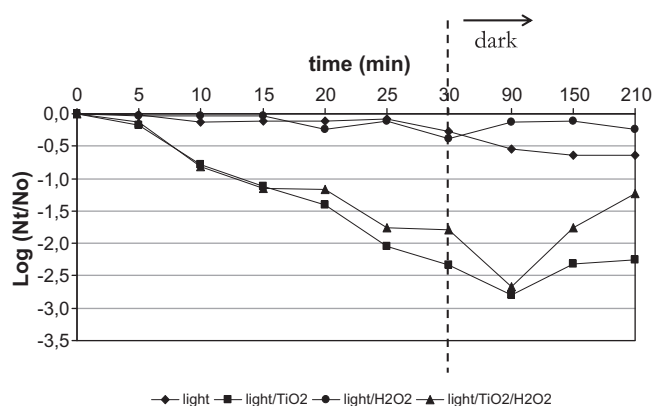


Fig. 1. Curves of *Enterococcus* sp. population removal during photolysis, photocatalysis, photolysis/ $H_2O_2$  and photocatalysis/ $H_2O_2$  treatments during 30 min and curves of bacterial recovery during 180 min in darkness. Range of  $\lambda$ : 320–800 nm. Intermittent illumination (stops every 5 min).  $[TiO_2] = 1$  g/L.  $[H_2O_2] = 0.04$  mM. Initial concentration  $\approx 10^8$  CFU  $100$  mL $^{-1}$ .

the photocatalytic process. These hydroperoxide radicals are less active as regards disinfection (Legrini et al., 1993). This demonstrates the importance of establishing the appropriate dose when combining treatments so as not to obtain an opposite effect to that being sought.

Maness et al. (1999) established the importance of the catalyst surface-microorganism interaction in order that the ROS radicals generated can act directly on the bacterium. If instead of a radical joining to the microorganism, two radicals join each other because their number is greater and the probability of joining between radicals increases, the bactericidal effectiveness of the treatment decreases and longer exposure times are required. It has also been recorded that organic and inorganic species naturally present in the sample and increased in a collateral fashion by the lysis of bacteria during treatment compete with the active bacteria for the radicals, reducing the disinfection effect of the treatments applied. The natural composition of water is thus another conditioning factor in the effectiveness of the treatment (Rincón and Pulgarin, 2007).

In a real photoreactor, the irradiation applied is not continuous on the sample because after treatment the water passes to areas of darkness. Even in the natural medium, clouds hinder continuous solar radiation during the hours of daylight (Rincón and Pulgarin, 2003). In order to evaluate the effect of the intermittent stops on the disinfection when carrying out the microbiological counts in relation to the time, the experiments were repeated making only one stop after 15 min (Fig. 2). It was observed that the continuous photolysis resulted in a higher bactericidal effect, with 0.63 logarithmic units of inactivation, compared to the intermittent photolysis (Fig. 1). The continuous photocatalysis obtained a lower disinfection compared to intermittent photocatalysis (1.6 log vs. 2.3 log) and the continuous photolysis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and photocatalysis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtained levels of inactivation similar to that obtained with intermittent

radiation. It is possible to conclude that the mode of application of >320 nm irradiation (intermittent or continuous) does not have a determining influence on the process of bacterial inactivation under the conditions applied.

However, Rincón and Pulgarin (2003) observed a clear difference between the results of the continuous and discontinuous photocatalysis applied to *E. coli*. Thirty minutes of continuous photocatalysis produced the same results, total inactivation, as intermittent photocatalysis after 90 min of treatment. However, under the study conditions of this research, the results observed are not conclusive. Longer treatments are necessary to obtain a total inactivation of *Enterococcus* sp. populations, both with the application of intermittent and continuous processes. These authors establish that during the stoppage periods, the bacterial auto-defence mechanisms are favoured, allowing the bacterium to stabilize in the presence of the aggression suffered and thus to withstand a possible new attack. On the other hand, some studies defend the effectiveness of interrupted treatments. Pham et al. (1995) observed that intermittent illumination reduced the number of spores of *Bacillus pumilus* more effectively than continuous exposure. The results obtained in this research and the diversity of results published in the scientific literature suggest that it is necessary to investigate the effect of interruptions in treatment involving solar radiation for each type of microorganism, as Rincón and Pulgarin (2003) also propose.

Finally, Figs. 1 and 2 illustrate the treatments applied followed by a dark period of 3 h in which the tendency of populations to recover after the stress suffered is observed. In Fig. 1, only the photocatalysis and photocatalysis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments manage to obtain disinfection of the sample, and a subsequent slight recovery of the populations is observed. In Fig. 2, where the illumination is continuous and as a consequence lower recounts would be expected because of the longer period of aggression, it is also observed a slight recovery in the photocatalysis and photocatalysis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments.

### 3.2. Treatments with UVB, UVA and visible radiation ( $\lambda = 290\text{--}800\text{ nm}$ )

Fig. 3 represents the inactivation curves of *Enterococcus* sp. during the treatments of photolysis, photocatalysis, photolysis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and photocatalysis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, all of them irradiated with a solar spectrum between 290 and 800 nm, which includes the UVB range. The results show a high level of disinfection in all the processes studied. The photolysis obtains an inactivation of 7.6 logarithmic units, the photolysis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment achieves 8.2 log and finally the photocatalysis and the photocatalysis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtain reductions of 5.5 and 5.9 units log, respectively. The interval of irradiation between 290 and 320 nm (UVB range) results much more effective in the *Enterococcus* sp. removal (see Fig. 1 ( $\lambda > 320\text{ nm}$ ) and Fig. 2 ( $\lambda > 290\text{ nm}$ )). This range of irradiation shows a high level of decomposition of hydrogen peroxide molecules, adding a higher number

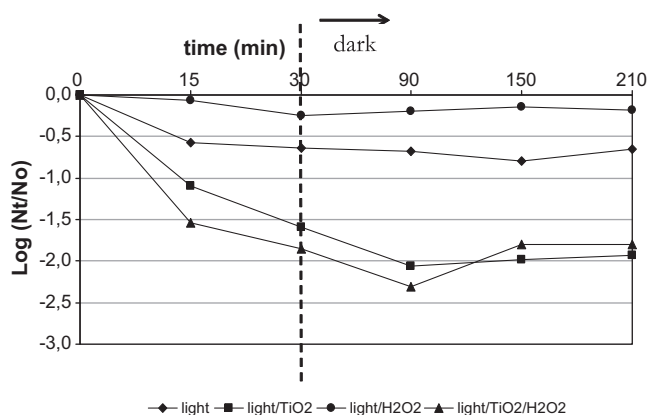


Fig. 2. Curves of *Enterococcus* sp. population removal during photolysis, photocatalysis, photolysis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and photocatalysis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments during 30 min and curves of bacterial recovery during 180 min in darkness. Range of  $\lambda$ : 320–800 nm. Continuous illumination (only one stop at 15 min). [TiO<sub>2</sub>] = 1 g/L. [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0.04 mM. Initial concentration  $\approx 10^8$  CFU 100 mL<sup>-1</sup>.

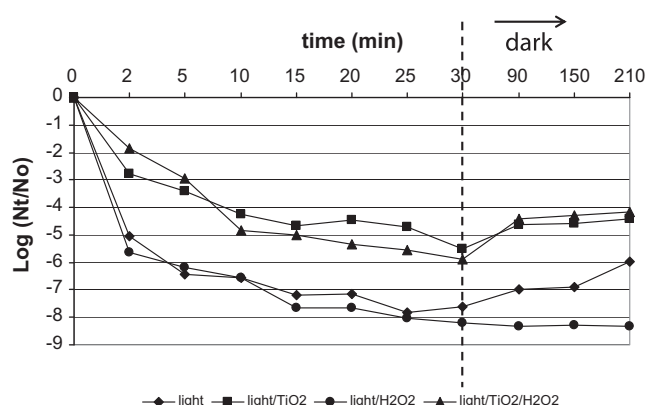


Fig. 3. Curves of *Enterococcus* sp. population removal during photolysis, photocatalysis, photolysis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and photocatalysis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments during 30 min and curves of bacterial recovery during 180 min in darkness. Range of  $\lambda$ : 290–800 nm. Intermittent illumination. [TiO<sub>2</sub>] = 1 g/L. [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0.04 mM. Initial concentration  $\approx 10^8$  CFU 100 mL<sup>-1</sup>.

of OH radicals to the medium and participating in the disinfection phenomenon of the sample. The addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> thus improves the level of inactivation obtained by photolysis and photocatalysis. On a statistical level, there are no significant differences ( $p > 0.05$ ) between the four treatments applied under the study conditions described.

These results highlight the limited relevance of the addition of TiO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, individually, on the individual effect of irradiation when this radiation includes the UVB range. The high bactericidal capacity of this range produces serious injuries to the genetic cellular material, preventing DNA replication and producing genetic mutations, as Benabbou et al. (2007) indicates. Under the conditions studied, the addition of substances which promote the generation of hydroxyl radicals is not necessary because the photolytic treatment by itself achieves a high disinfection level. However, Benabbou et al. (2007) obtained better results with the UVB/TiO<sub>2</sub> system than the UVB system on *E. coli* populations.

During the period of darkness after the treatments applied, the populations recover slightly except for those subjected to the photolysis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process, which remain constant. It would be expected, as the research of Rincón and Pulgarin (2003) shows, that in the treatments where the highest disinfections are obtained and where the level of cellular aggression is apparently high, a recovery of the cellular functions and thus of the populations would be difficult. Benabbou et al. (2007) did not observe bacterial development after the disinfection processes applied on *E. coli* populations with UVA, UVB or UVC radiation with or without TiO<sub>2</sub>. Dunlop et al. (2002) indicated that bacteria, after a stress period, can enter a non-growth state. After a period of darkness, they can recover their capacity to grow and return to their initial balance (dark repair). This behaviour could explain the results observed in darkness after the photolysis, photocatalysis and photocatalysis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments. Regarding the photolysis/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, it is probable that the damage produced by the quantity of

OH radicals generated was so severe that the auto repair mechanisms of the bacteria were not able to overcome the attack suffered under the conditions studied. Wist et al. (2002) defends the activation of microorganisms under stress conditions, arguing that they are simply inactivated before the treatment (photoreactivation). It is also important to take into account the type of bacterium studied. It would be of interest to extend the disinfection studies with other bacterial indicators, including viruses and parasites frequently present in waters and more resistant than faecal indicators, and to obtain in this way results closer to reality.

In order to avoid posterior regrowths in treated water, it would be advisable to obtain total inactivation of the microorganisms present in such water. Rincón and Pulgarin (2004b, 2007) suggest analysing the EDT parameter (effective disinfection time) to ensure the complete disinfection of the water treated. With this parameter it is hoped to determine the duration of the disinfection treatment to make sure of bacterial death and thus the end of the treatment. Another possible option is to use a secondary disinfectant, such as chlorine, to avoid regrowth from bacteria surviving the treatment. In this case, the generation of dangerous halogenated by-products will be substantially reduced because of the important reduction of organic matter levels present in water produced by the advanced oxidation treatments applied (Chong et al., 2010).

#### 4. Conclusions

The conclusions of this research work are summarized in the following points:

- The disinfectant power of UVA and visible irradiation is statistically improved by the presence of TiO<sub>2</sub> in the process, this not being the case with the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. When the UVB range is present in irradiation (290–800 nm), neither the addition of TiO<sub>2</sub> nor of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produces any significant improvement in *Enterococcus* sp. inactivation compared with the action of light by itself. Photolytic treatment is sufficient to obtain complete inactivation.
- The manner of application of irradiation (intermittent or continuous) does not have an influence on the inactivation process of *Enterococcus* sp. under the working conditions considered here.
- No bacterial inactivation or only a slight population recovery is observed during the period of darkness following all the treatments studied.
- The effectiveness of the process depends mainly on the type of bacterium on which the experimentation is carried out. *Enterococcus* sp. is more sensitive to the treatments studied than *C. perfringens* spores; however, it is less sensitive than the vegetative cells of this sporulated bacterium. It is considered of interest to extend knowledge of the effectiveness of AOPs on other microorganisms present in water, such as viruses and parasites,

given that their resistance is higher than that of the current reference indicators.

## Acknowledgements

This work is framed in the research projects “Aplicación de Técnicas de Oxidación Avanzada en la Potabilización de Aguas Naturales de la Cuenca del Río Ebro” (CTM2005-04585/TECNO) and “Regeneración de aguas depuradas mediante procesos de oxidación avanzada” (CTM2008-01876/TECNO) funded by the Ministerio de Ciencia e Innovación, FEDER and Aragon Government-Caixa Catalunya. The authors thank the Aragon Government the PhD grant to Munia Lanao.

## References

- Alrousan, D.M.A., Dunlop, P.S.M., McMurray, T.A., Byrne, J.A., 2009. Photocatalytic inactivation of *E. coli* in surface water using immobilised nanoparticle TiO<sub>2</sub> films. *Water Res.* 43, 47–54.
- Benabbou, A.K., Derriche, Z., Felix, C., Lejeune, P., Guillard, C., 2007. Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli*. Effect of concentration of TiO<sub>2</sub> and microorganism, nature, and intensity of UV irradiation. *Appl. Catal. B: Environ.* 76, 257–263.
- Blake, D.M., Maness, P.C., Huang, Z., Wolfrum, E.J., Huang, J., 1999. Application of the photocatalytic chemistry of titanium dioxide to disinfection and killing of cancer cells. *Separ. Purif. Method* 28, 1–50.
- Blanco, J., Malato, S., Fernández-Ibáñez, P., Alarcón, D., Gernjak, W., Maldonado, M.I., 2009. Review of feasible solar energy applications to water processes. *Renew. Sust. Energy Rev.* 13, 1437–1445.
- Cho, M., Chung, H., Choi, W., Yoon, J., 2004. Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO<sub>2</sub> photocatalytic disinfection. *Water Res.* 38, 1069–1077.
- Chong, M.N., Jin, B., Chow, C.W.K., Saint, C., 2010. Recent developments in photocatalytic water treatment technology: a review. *Water Res.* 44, 2997–3027.
- Dunlop, P.S.M., Byrne, J.A., Manga, N., Eggins, B.R., 2002. The photocatalytic removal of bacterial pollutants from drinking water. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 148, 355–363.
- Elmolla, E.S., Chaudhuri, M., 2009. Degradation of the antibiotics amoxicillin, ampicillin and cloxacillin in aqueous solution by the photo-Fenton process. *J. Hazard. Mater.* 172, 1476–1481.
- Elmolla, E.S., Chaudhuri, M., 2010. Comparison of different advanced oxidation processes for treatment of antibiotic aqueous solution. *Desalination* 256, 43–47.
- Fernández-Ibáñez, P., Blanco, J., Malato, S., De las Nieves, F.J., 2003. Application of the colloidal stability of TiO<sub>2</sub> particles for recovery and reuse in solar photocatalysis. *Water Res.* 37, 3180–3188.
- Gumy, D., Rincón, A.G., Hajdu, R., Pulgarin, C., 2006. Solar photocatalysis for detoxification and disinfection of water: different types of suspended and fixed TiO<sub>2</sub> catalysts study. *Sol. Energy* 80, 1376–1381.
- Hartmann, P.S., Eisenstark, A., 1978. Synergistic killing of *Escherichia coli* by near-UV radiation and hydrogen peroxide: distinction between repairable and nonrepairable damage. *J. Bacteriol.* 133, 769–774.
- Hoerter, J.D., Arnold, A.A., Kuczynska, D.A., Shibuya, A., Ward, C.S., Sauer, M.G., Gizachew, A., Hotchkiss, T.M., Fleming, T.J., Johnson, S., 2005. Effects of sublethal UVA irradiation on activity levels of oxidative defense enzymes and protein oxidation in *Escherichia coli*. *J. Photoc. Photobio. B: Biology* 81 (3), 171–180.
- Huang, Z., Maness, P.C., Blake, D.M., Wolfrum, E.J., Smolinski, S.L., Jacoby, W.A., 2000. Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis. *J. Photoc. Photobio. A: Chem.* 130 (2–3), 163–170.
- Kositzi, M., Poullos, S., Malato, S., Cáceres, J., Campos, A., 2004. Solar photocatalytic treatment of synthetic municipal wastewater. *Water Res.* 38, 1147–1154.
- Lanao, M., Ormad, M.P., Ibarz, C., Miguel, N., Ovelleiro, J.L., 2008. Bactericidal Effectiveness of O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> on *Clostridium perfringens*. *Ozone-Sci. Eng.* 30, 431–438.
- Lanao, M., Ormad, M.P., Goñi, P., Miguel, N., Mosteo, R., Ovelleiro, J.L., 2010. Inactivation of *Clostridium perfringens* spores and vegetative cells by photolysis and TiO<sub>2</sub> photocatalysis with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Sol. Energy* 84, 703–709.
- Ljubas, D., 2005. Solar photocatalysis—a possible step in drinking water treatment. *Energy* 30 (10), 1699–1710.
- Legrini, O., Oliveros, E., Braun, A.M., 1993. Photochemical processes for water treatment. *Chem. Rev.* 93, 671–698.
- Malato, S., Cáceres, J., Agüera, A., Mezcuá, M., Hernando, D., Vial, J., Fernández-Alba, A.R., 2001. Degradation of imidacloprid in water by photo-Fenton and TiO<sub>2</sub> photocatalysis at a solar pilot plant: a comparative study. *Environ. Sci. Technol.* 35, 4359–4366.
- Maness, P., Smolinski, S., Blake, D.M., Huang, Z., Wolfrum, E., Jacoby, W.A., 1999. Bactericidal activity of photocatalytic TiO<sub>2</sub> reaction: toward an understanding of its killing mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4094–4098.
- Miguel, N., 2010. Tesis doctoral. Estudio de la eliminación de plaguicidas presentes habitualmente en aguas de la cuenca del Ebro mediante procesos de oxidación avanzada. Universidad de Zaragoza.
- Miguel, N., Ormad, M.P., Rodríguez, J., López, A., Ovelleiro, J.L., 2010. Degradation of hazardous pollutants by photocatalytic treatments in water reclamation processes, in: Anque (Ed.), *Proceedings VII ANQUE International Congress T5-010.1-T5-010.2*. ISBN: 978-84-693-2257-4.
- Ormad, M.P., Miguel, N., Lanao, M., Mosteo, R., Ovelleiro, J.L., 2010. Effect of application of ozone and ozone combined with hydrogen peroxide and titanium dioxide in the removal of pesticides from water. *Ozone-Sci. Eng.* 32, 25–32.
- Peyton, G.R., Glaze, W.H., 1988. Destruction of pollutants in water with ozone in combination with ultraviolet radiation. *Photolysis of aqueous ozone*. *Environ. Sci. Technol.* 22 (7), 761–767.
- Pham, H.N., McDowell, T., Wikins, E., 1995. Photocatalytically-mediated disinfection of water using TiO<sub>2</sub> as a catalyst and spore-forming *Bacillus pumilus* as a model. *J. Environ. Sci. Health A Tox Hazard. Subst. Environ. Eng.* 30 (3), 627–636.
- Rincón, A.G., Pulgarin, C., 2003. Photocatalytic inactivation of *E. coli*: effect of (continuous–intermittent) light intensity and of (suspended–fixed) TiO<sub>2</sub> concentration. *Appl. Catal. B – Environ.* 44, 263–284.
- Rincón, A.G., Pulgarin, C., 2004a. Effect of pH, inorganic ions, organic matter and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on *E. coli* K12 photocatalytic inactivation by TiO<sub>2</sub>. Implications in solar water disinfection. *Appl. Catal. B – Environ.* 51, 283–302.
- Rincón, A.G., Pulgarin, C., 2004b. Bactericidal action of illuminated TiO<sub>2</sub> on pure *Escherichia coli* and natural bacterial consortia: post-irradiation events in the dark and assessment of the effective disinfection time. *Appl. Catal. B – Environ.* 49, 99–112.
- Rincón, A.G., Pulgarin, C., 2007. Solar photolytic and photocatalytic disinfection of water at laboratory and field scale. Effect of the chemical composition of water and study of the postirradiation events. *J. Solar Energy Eng.* 129, 100–110.
- Wist, J., Sanabria, J., Dierolf, C., Torres, W., Pulgarin, C., 2002. Evaluation of photocatalytic disinfection of crude water for drinking-water production. *J. Photoc. Photobio. A: Chem.* 147 (3), 241–246.